Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dietrich Plester

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN RESORPTION VON DREI GELATINESCHWAMMPRÄPARATEN IN VITRO- UND IN VIVOVERSUCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

NORBERT SALENBAUCH

aus

LEUTKIRCH

1977

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dietrich Plester

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN RESORPTION VON DREI GELATINESCHWAMMPRÄPARATEN IN VITRO- UND IN VIVOVERSUCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

NORBERT SALENBAUCH
aus
LEUTKIRCH

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. R. Lempp

1. Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. R. Langnickel
(Prof. Dr. D. Plester)

2. Berichterstatter: Akademischer Rat Dr. A. Jung

Meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben, in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0053

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND GERÄTE	9
1.	In-vitro-Versuche	9
1.1	Präparate	9
1.2	Chemikalien	9
1.3	Geräte	11
2.	Tierversuche	11
2.1	Präparate	11
2.2	Chemikalien	11
2.3	Geräte	11
III.	METHODEN	12
1.1	Bestimmung des spezifischen Gewichts der einzelnen Präparate	12
1.2	Benetzbarkeit der einzelnen Präparate	12
1.3	Auflösung der Schwämmchen in 1N Natronlauge	12
1.4	Enzymatische Abbaufähigkeit der Präparate	13
1.4.1	Puffer	13
1.4.2	Enzymansatz	13
1.4.3	Inkubationsansatz	13
1.5	Aminosäureanalyse	13
1.6	Photographische Darstellung der Präparate nach Vergrößerung und Beurteilung ihrer Oberflächenstruktur	13
1.7	Anfärbeversuche	13
1.7.1	Eichkurve	13
1.7.2	Anfärben der Schwämmchen und unterschiedliche Anfärbbarkeit	14
1.7.3	Auswaschmethode	14
1.7.4	Messreihe	15
1.8	Ermittlung der enzymatischen Abbauhemmung nach Anlagerung des Farbstoffs an das Schwämmchen	15
1.8.1	Aufstellung einer Verdünnungsreihe	15

		Seite
1.8.3	Ermittlung der optimalen Enzymkonzentration	15
1.8.4	Inkubationsansatz mit den angefärbten Schwämmchen zur Ermittlung der präparatspezifischen Enzymhemmung durch den angelagerten Farbstoff	16
1.9	Bestimmung des Formaldehydgehaltes (Formalisationsgrad) der einzelnen Präparate mit 2-Hydrazono-2,3,-dihydro-3methyl-benzothiazol-hydrochlorid (HMBT)	17
1.9.1	Versuchsdurchführung	17
2.1	Versuchstiere und Haltung	17
2.2	Operationsmethoden In- und Explantation der Präparate	18
2.2.1	Vorbereiten der Präparate	18
2.2.2	Vorbereiten der Tiere zur Operation	19
2.2.2.1	Anästhesie	19
2.2.2.2	Schaffung aseptischer Kautele	19
2.2.3	Operationsverfahren	20
2.2.3.1	Explantation und Messung der Restschwammenge	22
IV.	ERGEBNISSE	24
1.1	Spezifisches Gewicht der einzelnen Präparate	24
1.2	Benetzbarkeit	25
1.3	Auflösung der Schwämmchen in 1N Natronlauge	25
1.4	Enzymatische Abbaufähigkeit der Präparate	25
1.5	Aminosäureanalyse	26
1.5.1	Gelita	26
1.5.2	Spongostan	27
1.5.3	Marbagelan	27
1.6	Photographische Darstellung der Präparate nach Vergrößerung und Beurteilung der Oberflächenstruktur	28
1.7	Anfärbeversuche	30
1.7.1	Eichkurve	30
1.7.2	Anfärben der Präparate und ihre unterschiedliche Anfärbbarkeit	30

		Seite
1.7.3	Standardabweichung der Beladung bei 30 angefärbten Schwämmchen pro Präparat	31
1.8	Enzymatische Abbauhemmung nach der Anlagerung des Farbstoffs	34
1.8.1	Ermittlung der optimalen Enzymkonzentration	34
1.8.2	Hemmversuche	34
1.9	Formalisationsgrad der einzelnen Präparate	34
2.	Tierexperimentelle Resorption von Gelita, Spongostan und Marbagelan in der Bulla des Meerschweinchens	40
2.1	Durchschnittliche Standardabweichung der Abbauwerte vom arithmetischen Mittel derselben	41
V.	DISKUSSION	45
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	52
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	54

A B K Ö R Z U N G E N

ΔE_{diff}:	Extinktionswert der Farbstoffbeladung von Schwämmchen, der über die Differenz der Anfärbelösungsextinktion vor und nach dem Anfärben erzielt wird.
ΔE_{NaOH}:	Extinktionswert der Farbstoffbeladung von Schwämmchen, der über die Extinktionsmessung der in 1N Natronlauge aufgelösten Schwämmchen erzielt wird.
HMBT:	2-Hydrazono-2,3-dihydro-3methyl-benzothiazol-hydrochlorid.
FA.:	Formaldehyd
TRIS oder TES:	Hydromethylaminomethan

Z E I C H E N E R K L Ä R U N G

Zahlen in Klammern z.B. (10) bedeuten zugehörige Nummer im Literaturverzeichnis.

I. EINLEITUNG

Der Gebrauch von Gelatineschwamm in der Mittelohrchirurgie wurde im Laufe der letzten fünfundzwanzig Jahren immer aktueller. Mit den aufkommenden Prinzipien und Techniken der Tympanoplastik von ZÖLLNER und WULLSTEIN (1,2,3) ist untrennbar die Entwicklung und Verwendung von resorbierbaren Schwammstrukturen verbunden, die je nach Indikationsstellung zur Tamponade und zur Verödung von Operationshöhlen dienen, oder zur temporären Stützung und Ernährung von Transplantaten im Mittelohrbereich bestimmt sind (Abb. 1).

Bald wurde daher von vielen Autoren (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) z.B. nach der Wiederherstellung des Trommelfells durch Periost, Perichondrium, Vene oder Fascie PLESTER (34) und ähnlichen otochirurgischen Operationen die Füllung des Mittelohrs durch resorbierbare Gelatineschwammstücke empfohlen. Nur so konnte der zur Einheilung wichtige innige Kontakt zwischen Transplantat und Transplantatlager und auch die Ernährung desselben über das Flüssigkeitsdepot Schwamm gewährleistet werden.

Bekannt war die Verwendung dieser Schwämme bereits schon viel früher aus der Neurochirurgie, allerdings unter anderer Indikationsstellung, nämlich der der Hämostase, indem sie als Träger von Thrombin fungierten (CUSHING, 1911; INGRAHAM und BAILEY, 1944 (14). CORREL und WISE, 1945 (10) zeigten die Nichtantigenität des Gelatineschwamms, LIGHT und PRENTICE (11) die gute Gewebsreaktion und die völlige Resorbierbarkeit.

Auf HNO-ärztlichem Gebiet definierte WULLSTEIN, 1951 (23) zum erstenmal mit seinem "geformten Tropfen" die Verwendung von Gelatineschwamm in der Mittelohrchirurgie: "Stützung des freien Hauttransplantates, Erhaltung des freien Paukenlumens durch Material, das nach der Verflüssigung und Resorption gegen Luft ausgetauscht wird, Vermittlung der Ernährung für das Transplantat, antibiotisches Depot und Blutstillung".

Dabei lagen ihm die Erkenntnisse aus der Gewebszüchtung zugrunde, daß Zellwachstum vorwiegend wässriger Lösung bedarf, im Koagulum dagegen zum Stehen kommt (MORGAN et al. (19)). Die veränderte Indikationsstellung war aber von Problemen begleitet. Postoperative Adhäsivprozesse und Narbenbildungen und dadurch Behinderung der rekonstruierten Gehörknöchelchenmechanik wurden beobachtet (BAUER,1955 (12); JOSEPH, 1962 (13)). Diese sekundären Adhäsivprozesse und Vernarbungen im Bereich der Gehörknöchelchen und des Trommelfells beeinflussen entscheidend deren Mechanik, sodaß die theoretisch erreichbare Hörschwelle nach unten verschoben würde. Verklebungen im Bereich des Hypotympanons und besonders im Bereich des Ostiums der Tube können leicht zu Obliterierung führen, was eine Wiederbelüftung des Mittelohrs nach solchen Eingriffen unzureichend oder unmöglich macht und dadurch das Hörvermögen verschlechtert.

Als Ursache hierfür wurde der zu langsame Abbau der Schwammtamponade (Abb. 1) angesehen. Deshalb wurden innerhalb der letzten zwanzig Jahre eine Reihe von Untersuchungen über das genaue Verhalten der Schwämme an verschiedenen Versuchstieren und mit unterschiedlichen Substanzen durchgeführt (Tab. I, S. 6, 7, 8).

BAUER (1955) implantierte Spongostan, Fibrinschwamm, Gelitatampon und Nativgelatine in das Mittelohr des Guineaschweines. Er fand Bindegewebs- bzw. Narbenbildung bei allen vier Präparaten (12). KLEY (1955) implantierte mit Penicillin-Hyalonuridase getränkt Gelita-Tampon und Kollagenschwamm auf dieselbe Weise bei Hunden (16). Auch er beschreibt Narbenbildung und empfiehlt wiederholte Lufteinblasungen nach der Operation durch die Tuba auditiva, womit seiner Meinung nach solche Prozesse vermieden werden könnten.

Allerdings liegt dieser Auffassung die Annahme zugrunde, daß die über leukozytären Abbau verflüssigte Gelatine ausschließlich über die durchgängige Tube durch Abfluß und nicht durch Resorption beseitigt wird. An anderer Stelle erwähnt er (17), daß es bei geringer entzündlicher Reaktion in der Umgebung des Schwämmchens zu einer Fibrinablagerung in das Schwammgerüst kam und nach Abbau des Schwammes dieser durch Narbengewebe ersetzt wurde.
RAUCH (1958) berichtet über klinische Ergebnisse bei der Anwendung von Spongostan (18), jedoch ohne Angabe zur postoperativen Vernarbung. Er spricht lediglich von einer besseren Verträglichkeit dieses Präparates für den Menschen als für das Nagetier. WITHERS (1960) plazierte Gelita-Tampon in das Mittelohr von Katzen und fand sekundäre Fibrosierung (15). DOYLE und KELLY (1961) beschrieben bei einer von zwei Versuchsreihen eine fibroblastische Reaktion (20). JOSEPH (1962) entwickelte in seinen Versuchsreihen mit Mongrel Hunden eine Fibrosisskala von 1-10. Er stellte bei dem Präparat Gelita-Tampon in verschiedenen Versuchsgruppen unter Verwendung von Kochsalzlösung, Hydrokortisonen und Antibiotikas als Tränklösung fest, daß die Ausbildung von Narben nicht nur von der Verwendung eines Gelatineschwammes und entsprechender Lösung abhängt, sondern auch der präoperative Zustand der Mittelohrmukosa entscheidend sind. Hierzu setzte er künstlich Defekte in die Mukosa des Promontoriums und konnte so einen sprunghaften Anstieg der postoperativen Narbenbildung nachweisen (13).

Schließlich untersuchte BANDTLOW (1966) (21) bei Kaninchen mit den Präparaten Gelita-Tampon und Marbagelan den Einfluß von vor- und nichtvorinfiziertem Mittelohr auf das Operationsergebnis. Er stellte eine wesentlich größere Abbaugeschwindigkeit bei Vorinfektion der Kaninchenbulla fest und sprach Marbagelan wegen seiner zu langsamen Abbaufähigkeit die Verwendung bei der Tympanoplastik ab.

Soweit ein kurzer Überblick über den momentanen Stand der Literatur auf diesem Gebiet. Die Tabelle I (S. 6-8) zeigt die Übersicht über Autor, Versuchstier, Testmaterial, Resorptionszeit und Art der Gewebsreaktion.

Gemeinsam bei allen bis jetzt vorliegenden Untersuchungen ist die folgende Methode: nach Abtötung der Tiere, denen die Schwammpräparate über unterschiedliche Zeiträume in das Mittelohr implantiert worden waren, konnte durch histologische Aufbereitung und Befundung der entsprechenden Gewebsschnitte eine qualitative Aussage über den Verbleib des Schwammes gemacht werden, d.h. Restschwamm vorhanden oder nicht. Eine Berücksichtigung der Veränderung der Schwammstruktur war durch die aggressive histochemische Behandlung nicht möglich.

Problemstellung:

Der unterschiedliche Verwendungszweck von Gelatineschwamm in der Mittelohrchirurgie verlangt je nach Anwendungsbereich eine unterschiedliche Resorbierbarkeit. Mittels der Beladung mit überwiegend kovalent bindungsfähigem Farbstoff (vgl. S. 10), der unter nicht denaturierenden Bedingungen bei physiologischem pH keine wesentliche Veränderung der Struktur dieser Präparate erwarten ließ, wurde in nachstehenden Untersuchungen der Frage nachgegangen, ob bei den Präparaten Gelita-Tampon(R)1), Spongostan(R)2) und Marbagelan(R)3) unterschiedliche Resorptionsgrade nachweisbar sind.

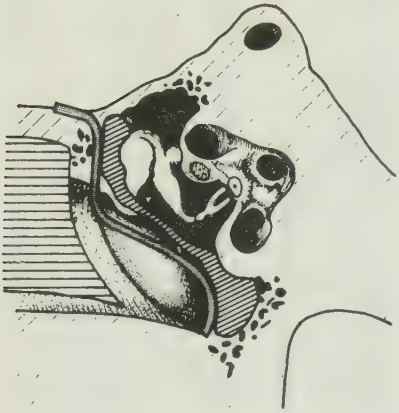
---

1) Gelita-Tampon hergestellt von der Fa. Braun Melsungen unter der Licenz der Fa. Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA

2) Spongostan hergestellt von der Fa. Ferrosan, Dänemark

3) Marbagelan hergestellt von der Fa. Behringwerke Ag. Marburg, Lahn

Modifizierte schematische Darstellung der
Lage und Abbaumöglichkeiten der Gelatineschwammtamponade
nach WULLSTEIN (22), KLEY, DOYLE u. KELLY



Lagerung des freien Transplantates ( ) bei Erhaltung einer schmalen Brükkenspange und der Gehörknöchelchenkette mit Trommelfellrest am Hammergriff

Gelatineschwamm
Gelita =
Marbagelan =

Abbaumöglichkeiten

Gelatineschwamm — bei raschem Abbau — Gelatineschwamm

↓ — ↓

Intrazellulärer Abbau nach Phagozytose durch Mikrophagen (neutroph. Granulozyten) u. Makrophagen (diff. Histiozyten) und Resorption durch die Schleimhaut

(DOYLE u. KELLEY)

Extrazelluläre Verflüssigung durch Enzymwirkung der Makro- u. Mikrophagen + intrazellulärer Abbau über Phagozytose

↓

Abfluß des Zelldetritus und der verflüssigten Gelatine über die Tuba auditiva

(KLEY)

↓ — bei langsamem Abbau — ↓

Abb. 1 Bindegewebige Substitution durch Granulationsgewebe im Sinne einer sterilen Entzündung

Tab. I: Ergebnisse früherer Untersuchungen

AUTOR	TIERART	PRÄPARAT	TAGE POST OP	BEFUND
BAUER 1955	Meerschweinchen	1. Spongostan	3 Tg.	Leukozytäres Infiltrat
			8 Tg.	Gefäßsprossung, Fibroblasten, Fibrozyten u. Plasmazellen
			21 Tg.	zu Strängen formiertes Bindegewebe
			28 Tg.	Osteoides Bindegewebe
			49 Tg.	Immer noch unverändertes Spongostan nachweisbar
		2. Fibrinschwamm	10 Tg.	Sterile Eiterung
			49 Tg.	Material praktisch unverändert
		3. Sorbacel	2 Tg.	Deutliche Zeichen der beginnenden Resorption
			63 Tg.	Dichtes leukozytäres Infiltrat keine Narbenstränge u. keine Implantatreste, Bulla reizlos
		4. Gelita-Tampon	2 Tg.	Gelita-Tampon u. leukozytäres Infiltrat
			12 Tg.	Keine Gelita mehr nachweisbar, Adhäsivprozesse
		5. Gelatine nativ	16 Tg.	nicht mehr nachweisbar
KLEY 1955	Hund	1. Gelita-Tampon (Upjohn)	7 Tg.	noch reichlich Gelita, Teil verflüssigt u. leukozytäres Infiltrat
			14 Tg.	Verflüssigte u. noch abzubauende Gelita, verstärkte Leukozyteninvasion mit dem Abstand zur Schleimhaut abnehmend
			23 Tg.	Leukozyten u. Zelltrümmer, keine Tamponade
			37-100 Tg.	Weder Tampon noch Zelldetritus
		2. Collagen-Tampon (Fa.Dr.Ruhland Neustadt)	--	Etwas langsamerer Abbau als Gelita

Tab. I: Fortsetzung Ergebnisse früherer Untersuchungen

AUTOR	TIERART	PRÄPARAT	TAGE POST OP	BEFUND
RAUCH 1958	unbek.	Spongostan	28 Tg.	Totaler Abbau
WITHERS et al. 1960	Katzen	Gelita-Tampon	42 Tg.	Gelitareste u. Narben
DOYLE u. KELLY 1961	Kaninchen	Gelatine-Schwamm	14 Tg.	Polymorphzelliges Infiltrat, besonders vielkernige Riesenzellen u. Fibroblasten
			21 Tg.	Plasmazellen u. Makrophagen Gelatinefasern mit Zellnestern
			35-49 Tg.	Fibröse Gewebsteile mit aktiven Fibroblasten und kollagenem Gewebe, Gelatineschwammreste
			63 Tg.	Reizlose Bulla, keine Narben oder Mukosaverdickungen
JOSEPH 1962	Hunde	Gelita-Tampon	14 Tg.	Kein Schwamm mehr nachweisbar
BANDTLOW 1966	Meerschweinchen	1. Gelita-Tampon	a)vorinfiziert	
			3 Tg.	Eiter
			5 Tg.	Eiter
			12 Tg.	wenig Eiter
			b)nicht vorinfiziert	
			3 Tg.	Gelita
			6 Tg.	Gelita
			12 Tg.	wenig Gelita
			27 Tg.	Gelita Reste

Tab. I: Fortsetzung Ergebnisse früherer Untersuchungen

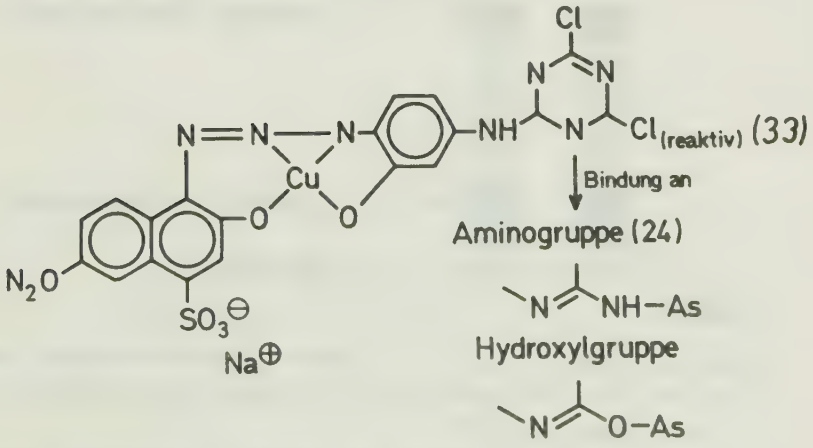
AUTOR	TIERART	PRÄPARAT	TAGE POST OP	BEFUND
Forts. BANDTLOW	dto.	2. Marbagelan	a) vorinfiziert	
			3 Tg.	Eiter u. Marbagelan
			6 Tg.	Eiter u. Marbagelan
			28 Tg.	Granulationsgewebe u. Marbagelan
			b) nicht vorinfiziert	
			3 Tg.	Marbagelan
			9 Tg.	Marbagelan
			12 Tg.	Marbagelan
			nach 30 Tg.	Marbagelan m. Narbengewebe

II. MATERIAL UND GERÄTE

1. In-vitro-Versuche

1.1 Präparate: Gelita-Tampon (Braun Melsungen Chargen Nr. 3391/2), Marbagelan (Behringwerke Marburg K-Nr. 1377), Spongostan (Ferrosan Dänemark ohne Chargen Nr. wurde im Oktober 1974 direkt von der Firma aus Dänemark bezogen),
Collagenase (Boehringer) Chlostridiopeptidase aus Chlostridium histiolyticum EC 3.4.24.3. Reinheitsgrad II, HMBT (2-Hydrazono-2,3-dihydro-3methylbenzothiazolhydrochlorid) Fa. Merck pro analysi.

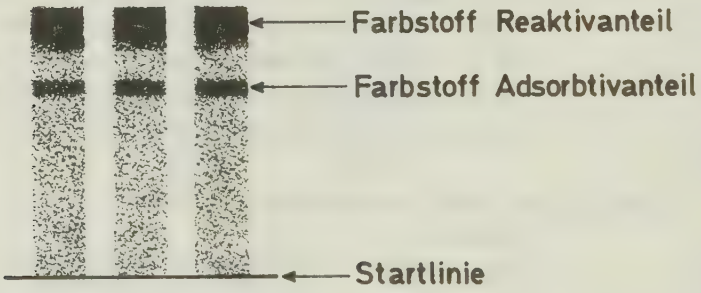
1.2 Chemikalien: TRIS (Hydroxymethylaminomethan) pro analysi,
Kalziumchlorid $CaCl_2x2H_2O$ pro analysi, 1N Natronlauge, Salzsäure konz.
Reaktivfarbstoff (Nr. 397) der Azoreihe mit folgender vorläufiger Strukturformel:



(33)

MG: 695
Aus Atomabsorptionsbestimmungen gewonnene Kupferbestimmungen deuten auf einen 1:2 Komplex hin (24, 25).
Der Farbstoff zeigt sich zu einem geringen Teil adsorptiv, zum größten Teil reaktiv; dies zeigt auch das Chromatogramm (Abb. 2).
Das Absorptionsmaximum liegt bei 530-560 nm.

1. Kieselgeldünnschichtchromatogramm in 4 : 1 Methanol Benzol



2. Kieselgeldünnschichtchromatogramm in 90% Äthanol

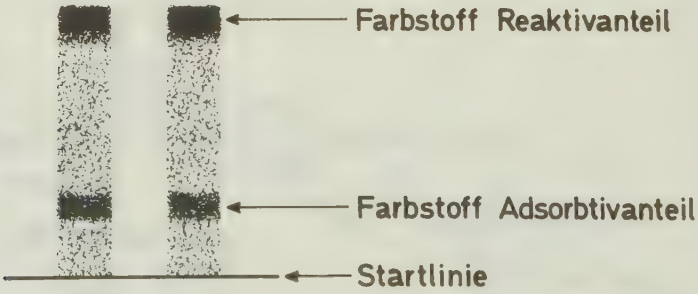


Abb. 2

Weitere Chemikalien: 0,2 % Eisen (III)-chloridlösung pro analysi, Aceton pro analysi, Formaldehyd 35 % Glasfiberfilter (Whatman GF/C).
Sämtliche Lösungen wurden mit doppelt-quarz-destilliertem Wasser angesetzt.

1.3 Geräte: Eppendorf Filterphotometer, Quarzküvetten 1 cm,
Zeissphotometer PM QII,
Glasküvetten SO/103,
Eppendorf Mikropipetten,
Analysenwaage (Mettler),
Zentrifuge (Stock, Marburg),
Beckmann Aminosäuren-Autoanalysator,
PH-Meter pH M 28 (Radiometer, Kopenhagen).

2. Tierversuche:

2.1 Präparate: Cargile Membrane C30 (Ethicon), Kodan-Spray (Schülke u. Mayr), Nebacetin-Spray (B.Braun, Melsungen), Histoacryl blau (Braun, Melsungen), 3x0 Nahtmaterial atraumatisch (Ethicon), Narkoseäther (Höchst).

2.2 Chemikalien: 25 % Urethanlösung pro analysi

2.3 Geräte: Zeiss OP-Mikroskop, Felsenbeinbesteck des Tier-OP der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, Tübingen.

III. METHODEN

1.1 Bestimmung des spezifischen Gewichts der einzelnen Präparate

Mit einer Rasierklinge wurden Schwammquader von jeweils 10 mm Kantenlänge geschnitten und zehn solche Blöcke jedes Präparates auf der Analysenwaage abgewogen und verglichen. Eine Rasierklinge wurde für jeweils 20 Schnitte benutzt.

1.2 Benetzbarkeit der einzelnen Präparate

Hierzu wurden die Schwämmchen in Wasser getaucht und Luftblasen in den Schwämmchen durch Andrücken der Schwämmchen an die Reagenzglaswand mittels eines Glasspatels entfernt. Nach dieser Manipulation wurden die Präparate auf noch vorhandene Glasblasen überprüft und nötigenfalls erneut auf dieselbe Weise behandelt.

1.3 Auflösung der Schwämmchen in 1N Natronlauge

Die Präparate wurden in 1N Natronlauge gelöst und ihr unterschiedliches Lösungsverhalten in NaOH nach folgenden Kriterien beurteilt:
a) Auflösung zu großen Partikeln,
b) zur Flockenform,
c) zur klaren Lösung.
Hierzu wurden jeweils 3 mg Schwämmchen in 1N Natronlauge gelegt und zur gleichmäßigen Durchfeuchtung mehrmals mit dem Glasspatel gewalkt. Die unterschiedlichen Auflösungskriterien wurden subjektiv bestimmt.

1.4 Enzymatische Abbaufähigkeit der Präparate

Gleiche Gewichtsteile der verschiedenen Schwammpräparate wurden unter identischen Bedingungen mit Collagenase bis zum Stadium des flockigen Abbaus und bis zur klaren Lösung inkubiert. (In Modifikation zu MANDL (27); NAGAI (28)).

1.4.1 Puffer: 0,05 M TES mit 0,36 mM $CaCl_2$ zur Enzymaktivierung, auf pH 7,5 mit konz. HCl eingestellt.

1.4.2 Enzymansatz: 1 mg Präparat (Collagenase) zu 1 ml Puffer.

1.4.3 Inkubationsansatz: in 1 ml Puffer 100 µl Enzymansatz und 3 mg Schwamm bei pH 7,5 und 37° C bis zur subjektiven Feststellung der genannten Zustände.

1.5 Aminosäureanalyse:

Die Schwämmchen wurden unter Stickstoff in Glasampullen mit 6N HCl 12 Std. bei 60-90° C hydrolysiert. Die Aminosäureanalyse wurde im Beckmann Autoanalysator durchgeführt.

1.6 Photographische Darstellung der Präparate nach Vergrößerung und Beurteilung ihrer Oberflächenstruktur

Hierzu wurden die Präparate im Dunkelfeldmikroskop ohne vorherige Inkubation in Stearin oder Ähnlichem photographiert und nach ihrer genauen Schwammstruktur beurteilt. Vergrößerung 40 x.

1.7 Anfärbeversuche

1.7.1 Eichkurve: 10 mg Farbstoff wurden in 10 ml Puffer

(0,05 M TES mit 0,36 mM $CaCl_2$, pH 7,5) und NaOH 1N gelöst = 1 mg/ml und hieraus eine lineare Verdünnungsreihe von 10-100 µg Farbstoff pro ml angelegt und bei 546 nm in einem Eppendorf Filterphotometer gemessen. Die ermittelten Extinktionen wurden gegen die Farbstoffkonzentration aufgetragen und als Eichkurve verwendet.

1.7.2 Anfärben der Schwämmchen und unterschiedliche Anfärbbarkeit

Hierzu wurden 3 mg Schwämmchen in einer Färbelösung (3 mg Farbstoff auf 10 ml Puffer; 0,05 M TES mit 0,36 mM $CaCl_2$, pH 7,5) über zwei Stunden angefärbt. Zur gleichmäßigen Benetzung wurden die Schwämmchen wie oben beschrieben mit dem Glasstab mehrmals durchgewalkt.
Die Beladung der Schwämmchen wurde bestimmt durch:

a) Extinktionsabnahme der Färbelösung nach Entnahme des Schwämmchens. (ΔE_{diff})
b) Photometrische Bestimmung des von den Schwämmchen aufgenommenen Farbstoffs. Hierzu wurden die Schwämmchen nach der Entnahme aus der Färbelösung mit Puffer nach der unten beschriebenen Methode von nichtgebundenem Farbstoff freigewaschen, in 1 ml 1N NaOH gelöst und im Photometer bei 546 nm gemessen. (ΔE_{NaOH})

1.7.3 Auswaschmethode: Jedes angefärbte Schwämmchen wurde in eine Einmalspritze gelegt, deren Boden mit einer Glasfaserfilterschicht bedeckt war und mit Puffer (0,05 M TES, 0,36 mM $CaCl_2$, pH 7,5) bis zur Farblosigkeit der Spüllösung gewaschen. Die Einmalspritze mit Schwämmchen wurde dann in ein mit Puffer gefülltes Zentrifugenglas gestellt und 2 Min. bei ~1200 x g (ν = max) zentrifugiert.

1.7.4 Messreihe: Von jedem Präparat wurden jeweils sechs Reihen zu je 5 Einzelschwämmchen nach den beiden beschriebenen Methoden auf ihre Farbstoffbeladung überprüft.

1.8 Ermittlung der enzymatischen Abbauhemmung nach Anlagerung des Farbstoffs an das Schwämmchen

Hierzu wurden die Schwämmchen in verschieden konzentrierten Farbstofflösungen angefärbt und anschließend unter gleichen Bedingungen enzymatisch abgebaut.

1.8.1 Aufstellung einer Verdünnungsreihe: Aus vier Stammlösungen (1 mg/ml, 0,9 mg/ml, 0,8 mg/ml und 0,7 mg/ml) wurden durch jeweils zwei Verdünnungen der Ausgangslösung mit dem bekannten Trispuffer insgesamt zwölf Anfärbelösungen mit steigender Farbstoffkonzentration bekannter Größe hergestellt.

1.8.2 Schwämmchen mit 3 mg wurden in 1 ml der Lösungen zwei Std. angefärbt und nach oben beschriebenem Verfahren ausgewaschen.

1.8.3 Ermittlung der optimalen Enzymkonzentration:
Zur Ermittlung der günstigsten Enzymkonzentration, mit der die verschiedenen Präparate etwa innerhalb einer Stunde weitgehend abgebaut sind, wurden folgende Enzymmengen zu den Inkubationsansätzen pipettiert:
Gelita: 0,025; 0,05; 0,1 mg Collagenase
Spongostan: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 mg Collagenase
Marbagelan: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 mg Collagenase
mit 1 ml Puffer (0,05 M TES, 0,36 mM $CaCl_2$, pH 7,5) Vol/Ansatz und 3 mg Schwamm.

Es wurde bei 37° C bis zum Stadium "flockige" und "klare Lösung" inkubiert. Enzymkonzentrationen, die Abbauwerte um oder unter einer Stunde bis zur klaren Lösung zeigten, wurden ausgewählt, um Störungen durch den bei längeren Abbauzeiten eintretenden bakteriellen Abbau auszuschließen.

1.8.4 Inkubationsansatz mit den angefärbten Schwämmchen zur Ermittlung der präparatspezifischen Enzymhemmung durch den angelagerten Farbstoff

Die von jedem Präparat entsprechend der Verdünnungsreihe angefärbten Schwämmchen (3 mg) wurden bei der oben für die verschiedenen Präparate ermittelten optimalen Enzymkonzentration (0,025 mg bei Gelita, 0,2 mg bei Spongostan und 0,5 mg bei Marbagelan) zu 1 ml Puffer (0,05 M TES, 0,36 mM $CaCl_2$, pH 7,5) pipettiert und bei 37° C so lange inkubiert, bis das Schwämmchen mit der geringsten Farbstoffbeladung vollständig abgebaut war. Der enzymatische Abbau wurde durch Abkühlen der Ansätze auf 0° C beendet und der durch den proteolytischen Abbau freigesetzte Farbstoff photometrisch bei 546 nm bestimmt. Dabei wurde die Farbstoffbeladung vor dem enzymatischen Abbau der Schwämmchen mit dem Extinktionswert der Lösung nach Abbruch der Abbaureaktion prozentual verglichen und Ausgangsextinktion der Beladung und prozentualer Abbau zueinander in Funktion gesetzt. Die resultierende Kurve zeigt nach Extrapolierung gegen null den Abbau bzw. reziprok die Hemmung des Abbaus der Schwämmchen bei jeder der verschiedenen Farbstoffkonzentrationen.

1.9 Bestimmung des Formaldehydgehaltes (Formalisationsgrad) der einzelnen Präparate mit 2-Hydrazono-2,3-dihydro-3-methyl-benzothiazol-hydrochlorid (HMBT), (30, 31, 32)

1.9.1 Entsprechend der Arbeitsanleitung "Merck-Reagenzien" wurde eine Eichkurve zwischen 0 und 175 µg Formaldehyd (FA) erstellt. Verschiedene FA-Konzentrationen erbrachten nach Reaktion mit 0,4 % HMBT-Lösung und 0,2 % Eisen-(III)-chlorid-Lösung eine bestimmte Extinktion. Hierzu wurden jeweils 5 ml FA-Lösung, die die entsprechende FA-menge zwischen 0 und 175 µg FA enthielten mit 5 ml der wässrigen 0,4 % HMBT-Lösung versetzt. Die Mischung wurde 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nun wurden 25 ml 0,2 % Eisen-(III)-chlorid-Lösung zugegeben. Nach weiteren 5 Min. wurde die Mischung mit Aceton auf 100 ml ergänzt und die Extinktion bei 650 nm in einem Zeiss Photometer PMQII gegen einen Reagenzienleerwert gemessen.

2.1 Versuchstiere und Haltung

Die von uns verwendeten Meerschweinchen erhielten wir freundlicherweise von Herrn Prof.Dr.Bader aus dem Hygieneinstitut der Universität Tübingen. Es handelte sich um meist weibliche Tiere aus der Züchtung Schmid in Holzgerlingen (Württ.). Sie wurden in Käfigen zu je fünf und zehn bei gleicher Platzgabe bei Zimmertemperatur und 12 Stunden Tag/Nacht-Rhytmus gehalten. Ihre Standardnahrung bestand aus Gras, zerhackten Rüben, Kraftfutter (Fa. Brauch - Puriner Kraftfutter GmbH, Krefeld) Mikro-Mix und Wasser ad libitum.

2.2 Operationsmethoden In- und Explantation der Präparate

Insgesamt wurden 130 Tiere in zwei Operationsetappen operiert, die erste zwischen 29.5.75 und 9.7.1975 mit dem Präparat "Gelita-Tampon(R)", die zweite zwischen 17.9.75 und 19.11.1975 mit den Präparaten "Spongostan(R)" und "Marbagelan(R)". Für einen Implantationszeitraum wurden jeweils fünf Versuchstiere angesetzt. Die gesamte Operations- und Anästhesiemethode wurde vor Beginn der Operationsreihen auf ihre Durchführbarkeit getestet.

2.2.1 Vorbereiten der Präparate:

Es wurden pro Operationstermin entsprechend der Anzahl der Tiere fünf Schwämmchen eines Präparates zu 3 mg auf Analysenwaagengenauigkeit abgewogen. Drei-mg-Schwämmchen hatten sich bei der Erprobung der Operationsmethode von der Bullafüllung her trotz des unterschiedlichen spezifischen Gewichtes als günstig erwiesen.
Sie wurden nach oben genannter Methode angefärbt und ausgewaschen. Die Konzentration des Farbstoffes in der Färbelösung wurde so gewählt, daß die nach 1.8 ermittelte Hemmung des enzymatischen Abbaus durch Farbstoffbeladung der Schwämmchen nicht mehr als 35 % betrug. Gleichzeitig mußte eine ausreichende Extinktion erreicht werden, auch wenn nur noch kleine Schwammreste nach Explantation aus dem Versuchstier zur Messung zur Verfügung standen. Die Schwämmchen wurden in 1 ml 0,5 M TES und 0,36 mM $CaCl_2$, pH 7,5 mit 0,3 mg Farbstoff/ml über zwei Stunden angefärbt und nach 1.7.3 ausgewaschen. Die angefärbten Präparate wurden in verschließbaren Plastikgefäßen in einem ml Pufferlösung (0,5 M TES, 0,36 mM $CaCl_2$, pH 7,5) bei ca.10° C bis zum nächsten Tag, d.h. minimal 7 Std., maximal 12 Std. bis zur Implantation aufbewahrt.

2.2.2 Vorbereiten der Tiere zur Operation

Die Tiere wurden ca. eine halbe Stunde nach Entnahme aus dem Tierstall operiert. Die durchschnittliche Operationsdauer lag bei 25 Min., so daß etwa 100 Min. zwischen dem Operationstermin des ersten und letzten Tieres einer Termingruppe lagen.

Die Untersuchung der Tiere auf ihren Gesundheitszustand erstreckte sich auf eine Beurteilung des Allgemeinzustandes und des Zustandes des zu operierenden Mittelohrs. Hierbei wurde mit einem speziell kleinen Ohrtrichter das Trommelfell unter dem Operations-Mikroskop überprüft. Deutlich sichtbarer Hammeransatz und rosa Transparenz waren die Kriterien. Auch Tiere, die früher bereits eine Otitis media durchgemacht hatten, wurden aussortiert. Dies war an der durch Reaktionsknochen verdickten Mastoidschuppe und der dadurch bedingten erschwerten Perforierbarkeit zu erkennen. Es wurden damit nur Tiere ohne erkennbaren pathologischen Befund zu den Versuchen verwendet.

2.2.2.1 Anästhesie

Als Basisnarkotikum wurde eine 25 % Urethanlösung verwendet. Je nach Alter der Tiere wurden bei 4-wöchigen 1,2 ml, bei 5-wöchigen 1,5 ml i.p. injiziert. Die Tiere waren damit in der Regel gut für die Operation vorbereitet. Der Eingriff selbst wurde unter Äthernarkose im "Offenen System" ausgeführt.

2.2.2.2 Schaffung aseptischer Kautele

Kopf und retroaurikulärer Bereich wurden zunächst mit Tupfer und Kodanspray(R) gereinigt, und die Behaarung hinter dem Ohr, im Nacken und Halsbereich mit einer gebogenen Schere auf ein Minimum gekürzt und nochmals mit Kodan desinfiziert.

2.2.3 Operationsverfahren (siehe hierzu Abb. 3)

Der Zugang zur Bulla (Mittelohr) des Meerschweinchens wurde über die Mastoidschuppe durch einen retroaurikulären Schnitt erreicht. Die genaue Schnittführung erfolgte ca. 3 mm parallel zum Ohrmuschelansatz nach caudal versetzt auf einer Länge von 3-3,5 cm, wobei das untere Schnittdrittel leicht zum Unterkieferwinkel hin geneigt wurde. Nach scharfer Durchtrennung der Oberhaut und der oberflächlichen Halsfascie wurde die am cranialen Mastoidanteil ansetzende Nackenmuskulatur nach cranial verdrängt. Der Ansatz des M.sternocleidomastoideus am Mastoid wurde scharf abgetrennt und gegen den Ansatz der Ohrmuschelweichteile nach caudal gespreizt. Am ventralen Teil der Mastoidschuppe war zur ausreichenden Übersicht noch der Ansatz der mittleren Halsfascie unter strenger Schonung des darunter gelegenen Plexus pterygoideus darzustellen und die Operationswunde in ventrocranialer Richtung zu spreizen. Das nun freiliegende Planum mastoideum zeigte seine typische rauhe Kompactaoberfläche. Die Knochenlamelle des reizlosen nicht infizierten Mittelohrs ließ sich mit einem Stichel leicht trepanieren und die Knochensplitter nach Ablösung von der Mittelohrschleimhaut mit der Pinzette entfernen. Die Defektgröße lag im Allgemeinen bei 4-5 mm^2. Nach erfolgter Trepanation mußte völlige Blutfreiheit gewährleistet sein, um spätere Störungen durch Blutfarbstoffe im Präparat möglichst gering zu halten. Bei starker Vergrößerung konnte nun der Anulus tympanicus unmittelbar unterhalb des cranialen Defektrandes und in der Tiefe Teile der Schnecke eingesehen werden. Auch hier konnte die Bulla nochmals auf ihren reizlosen Zustand überprüft werden. Das vorbereitete Schwämmchen wurde nun aus seiner Pufferflüssigkeit entfernt und in voll getränktem Zustand mit einer Mikropinzette langsam

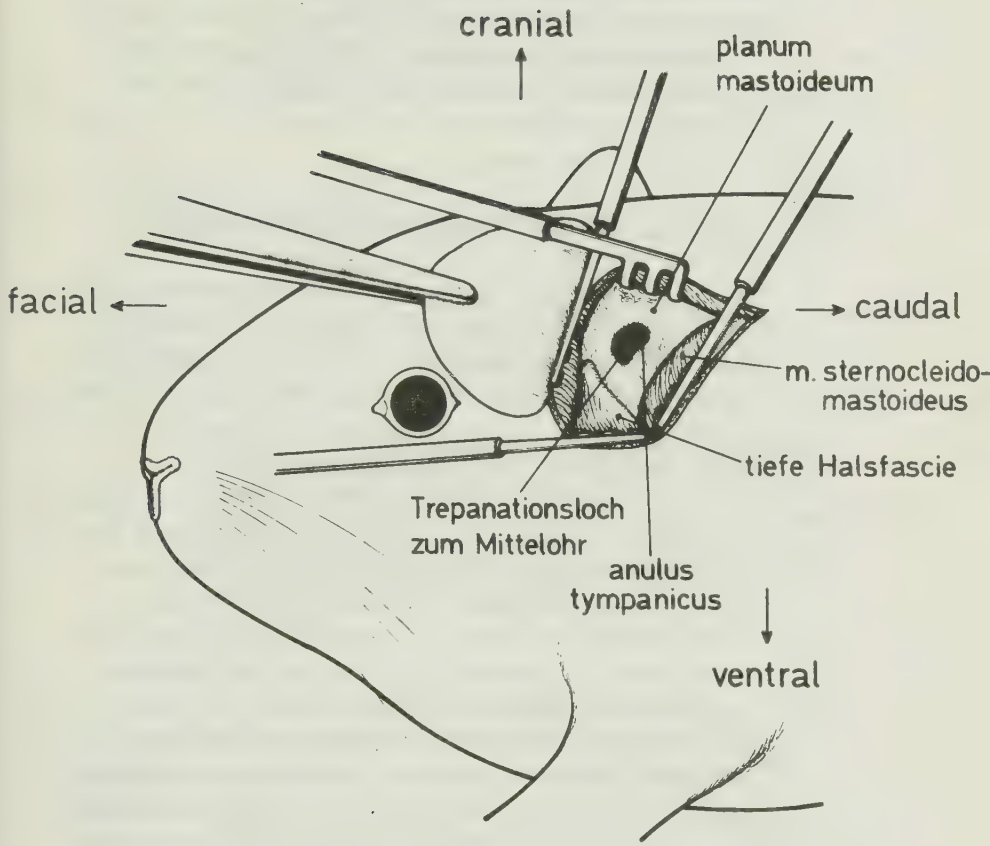


Abb. 3

durch die Trepanationsöffnung geschoben, bis der gesamte Schwamm sicher keinen Kontakt mit dem Öffnungsrand mehr hatte. Nach Trockenlegung des Defektrandes wurde eine ausreichend deckende Lamelle aus Cargile Membrane(R) über die Knochenöffnung geschoben und zur Befestigung und Abdichtung zirkulär

mit Histoacryl(R) benetzt. Nach Säuberung der Operationswunde mit physiologischer Kochsalzlösung wurde mit 3X0 Nahtmaterial (Ethicon) verschlossen. Antibiotischer Schutz wurde lediglich lokal mit Nebazetinspray(R) gegeben. Die Nähte wurden belassen; sie stießen sich bei längerer Implantationszeit von selbst ab.

2.2.3.1 Explantation und Messung der Restschwammenge

Für das Auffinden von eventuellen Schwammresten am Fundus des Mittelohres war eine großzügige Freilegung desselben notwendig. Um daher bei Wiedereröffnung des Mastoids ausreichend Blutleere zu haben, wurden die Tiere eine Stunde vor Explantation des Restschwämmchens durch Genickschlag abgetötet.
Vor Eröffnung der knöchernen Höhle wurden sämtliche Weichteile im Bereich des Mittelohrs entfernt und mit aufgeschlagenen Tupfern zum Knochen hin abgegrenzt. Die großzügige Eröffnung des Mittelohrs machte meist eine völlige Abtrennung des ventralen Mastoidanteils notwendig, da nur so das gesamte Bullalumen eingesehen werden konnte.
Die Schwammreste wurden mit einer Mikropipette aus dem Mittelohrlumen entfernt, ihr Aussehen subjektiv beurteilt, wobei besonders auf die Bruchstückgröße und auf Granulationsgewebsbildung geachtet wurde und in Puffer (0,5 M TES, 0,36 mM $CaCl_2$, pH 7,5) gelegt. Hier konnte sich bis zum Messvorgang eventuell vorhandener Zelldetritus, Blut- oder Exsudatreste durch ihre größere Dichte bis zu einem gewissen Grad abscheiden. Etwa 2-3 Std. später wurden dann die Schwammreste aus dem Puffer entnommen in 1 ml 1N NaOH gelöst und im Photometer bei 546 nm die Extinktion bestimmt. Aus der gewonnenen Extinktion wurde der erfolgte Abbau der Schwämmchen wie folgt berechnet:

Die Ausgangsbeladung wurde dabei wieder wie in 1.7.2 über die Extinktionsdifferenz der Anfärbelösung vor und nach dem Anfärben ΔE_{diff} und Auflösung der angefärbten Schwämmchen in 1N NaOH und Messung der Lösungsextinktion ΔE_{NaOH} bestimmt.

$$\Delta E_{diff} : 100 = \Delta E_{restschwamm} : x_1 \qquad 100 - x_1 = \% \text{ Abbau}$$

$$\Delta E_{NaOH} : 100 = \Delta E_{restschwamm} : x_2 \qquad 100 - x_2 = \% \text{ Abbau}$$

Nach Berücksichtigung der enzymatischen Abbauhemmung durch Farbstoffanlagerung, die aus den Funktionen in IV. 1.8 sich ergeben hatten und für jeden Schwämmchenbeladungswert abgelesen werden konnte, ergaben sich folgende tatsächlichen Abbauwerte:

$$\% \text{ Abbau} + \% \text{ Hemmung} = \text{tatsächlicher Abbau}$$

Durch Auftragen der prozentualen Abbauwerte des tatsächlichen Abbaus gegen die verschiedenen Implantationszeiträume konnte der zeitabhängige Abbau der einzelnen Präparate dargestellt werden.

IV. ERGEBNISSE

1.1 Spezifisches Gewicht der einzelnen Präparate

Tab. II:

Folgende Gewichte wurden gemessen:

in mg	Gelita	Spongostan	Marbagelan
1.	10,0	9,5	14,3
2.	11,5	9,8	14,9
3.	12,0	10,0	13,9
4.	11,25	9,2	14,2
5.	11,4	8,9	13,0
6.	11,8	9,3	14,5
7.	9,9	9,4	14,8
8.	10,4	9,8	15,0
9.	10,8	9,1	14,2
10.	11,3	9,7	14,3
arithmet. Mittel	11,03	9,47	14,31
Standard-abweichung vom Durch-schnitts-gewicht σ	0,6974	0,35292	0,57821
σ^2	0,4864	0,12455	0,33430
nach Um-rechnung auf mg/cm^3	12,25 mg/cm^3	10,52 mg/cm^3	15,74 mg/cm^3

1.2 Benetzbarkeit der einzelnen Präparate

In reinem bidestilliertem Wasser zeigt Marbagelan das beste Eintauchvermögen, während Gelita und Spongostan sich zunächst auf der Wasseroberfläche hielten. Beim Ausdrücken der Schwämmchen gegen die Gefäßwand wurde Gelita am schnellsten blasenfrei, nicht ganz so schnell Spongostan, während Marbagelan erst nach mehrmaligem Durchwalken mit dem Glasstab als blasenfrei vollgesaugt betrachtet werden konnte.

1.3 Auflösung der Schwämmchen in 1N Natronlauge

Kommt Natronlauge mit Proteinen in Kontakt, so werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidketten des Proteinmoleküls aufgehoben und es kommt zur Lösung.

Die Zeitabhängigkeit der Lösung der Schwämmchen in 1N NaOH bei Zimmertemperatur war wie folgt:

Auflösung bis zum	Gelita	Spongostan	Marbagelan
Stadium flockige Lösung	2 Std.	3 Std. 10 Min.	ca. 5 Std.
Stadium klare Lösung	2 Std. 20 Min.	3 Std. 45 Min.	ca. 9 Std.

1.4 Enzymatische Abbaufähigkeit der Präparate

Alle Präparate wurden von Collagenase abgebaut, was eindeutig für Kollagen als Ausgangsmaterial der Schwämmchen spricht.

Im Einzelnen wurden folgende Zeiten benötigt:

Abbau bis zum	Gelita	Spongostan	Marbagelan
Stadium flockige Lösung	5 Min.	50 Min.	ca. 6 Std.
Stadium klare Lösung	10 Min.	ca. 5 Std.	ca. 15 Std.

1.5 Aminosäureanalyse

Besondere Beachtung galt hierbei den typischen Aminosäuren des Collagens Glycin, Prolin und Hydroxyprolin und selten auch Hydroxylysin.

1.5.1 Gelita: Analysen-Nr. 2772 (Physiolog.Chem.Inst.Univ. Tübingen)

bezogen auf Gly = 34

Asp.: 4,77
Thre.: 1,57

Ser.:	3,67	1/2 Cys.:	-	Tyr.:	0,29
Glu.:	7,68	Val.:	2,31	Phe.:	1,47
Pro.:	18,26	Meth.:	0,39	Lys.:	3,62
Gly.:	34,00	Ile.:	1,08	NH_3 :	4,68
Ala.:	11,67	Leu.:	2,72	Arg.:	5,95

1.5.2 Spongostan: Analysen-Nr. 2771 (Physiolog.Chem.Inst. Univ. Tübingen)

bezogen auf Gly.: = 34

Asp.:	4,66	Val.:	1,17	NH_3 :	1,58
Thre.:	1,57	Meth.:	0,60	Arg.:	5,00
Ser.:	3,47	Ile.:	1,19	enthält außerdem	
Glu.:	7,55	Leu.:	2,62	noch:	
Pro.:	16,72	Tyr.:	-	Hydroxyprolin und	
Gly.:	34,00	Phe.:	1,33	Hydroxy- und Allo-	
Ala.:	11,97	Lys.:	2,49	hydroxylysin	

1.5.3 Marbagelan: Analysen-Nr. 2770 (Physiolog.Chem.Inst. Univ. Tübingen)

bezogen auf Gly.: = 34

Asp.:	4,75	Val.:	2,20	NH_3 :	7,49
Thre.:	1,54	Meth.:	0,87	Arg.:	5,14
Ser.:	3,77	Ile.:	1,01	enthält außerdem	
Glu.:	7,77	Leu.:	2,55	noch:	
Pro.:	13,84	Tyr.:	0,40	Hydroxyprolin und	
Gly.:	34,00	Phe.:	1,34	Hydroxy- und Allo-	
Ala.:	11,28	Lys.:	4,89	hydroxylysin	

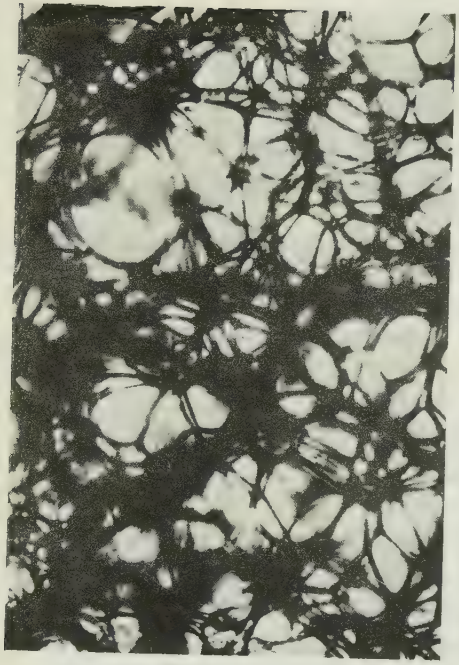
Es handelt sich bei allen drei Präparaten um Kollagen als Grundsubstanz, wobei Gelita-Tampon durch das Fehlen von Hydroxyprolin auffällt. Die Verwendung von Collagenase als Abbauenzym bei den In-vitro-Versuchen war daher gerechtfertigt.

1.6 Photographische Darstellung der Präparate nach Vergrößerung und Beurteilung der Oberflächenstruktur (Abb. 4)

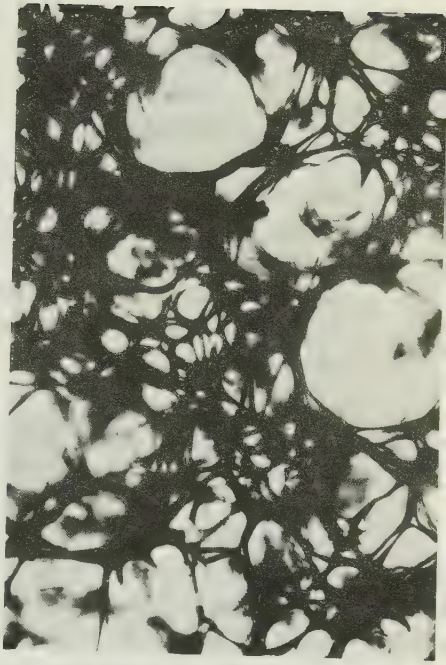
Gelita-Tampon zeigt eine regelmäßige Schwammstruktur mit dünnen, gerade verlaufenden Trabekeln, die Porengröße ist relativ regelmäßig.

Spongostan zeigt ebenfalls typische Schwammstruktur mit etwas dickeren Trabekeln. Die Porengröße ist sehr unregelmäßig, wodurch es zu häufigen Massenansammlungen um kleinere Poren und Trabekelteilungsstellen kommt.

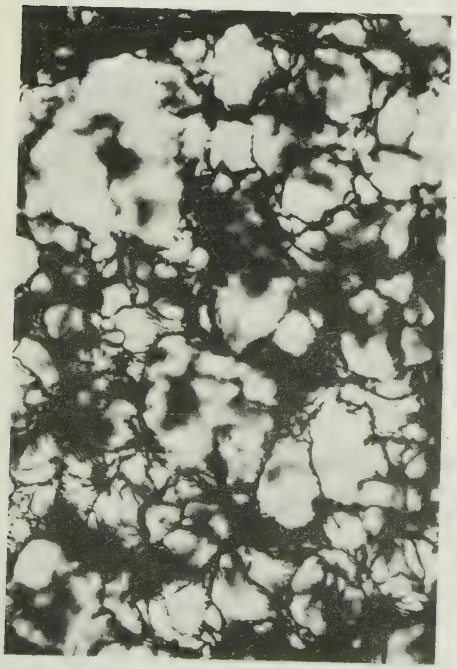
Bei Marbagelan fällt zunächst die unregelmäßige und schwammuntypische Struktur auf. Die Trabekel sind in sich ungleichmäßig und verzweigt und enden oft frei im Porenlumen, die Poren selbst sind regelmäßig, Massenansammlungen sind besonders häufig.



GELITA



SPONGOSTAN



MARBAGELAN

MAßSTAB

ABB. 4

1.7 Anfärbeversuche

1.7.1 Eichkurve (Abb. 5)

Der Farbstoff war in 1 N NaOH und in 0,5 M TES Puffer (0,36 mM $CaCl_2$ pH 7,5) gut löslich.

Die Farbstoffkonzentration war der Extinktion proportional. Die Eichkurve war zwischen 0 und 100 µg Farbstoff pro ml Lösungsmittel linear.

1.7.2 Anfärben der Präparate und ihre unterschiedliche Anfärbbarkeit (Abb. 6)

Die bereits in früheren Untersuchungen (34) angeführte reaktive Bindungsfähigkeit (kovalente Bindung) des Farbstoffs an Proteine bei neutralem pH über die Amino- und Hydroxylgruppen der Aminosäuren konnte bestätigt werden. Nach oben genannter Auswaschmethode der angefärbten Präparate war praktisch kein Farbstoff vom beladenen Schwamm mehr lösbar. Der adsorbtive Farbstoffanteil wurde hierbei völlig ausgewaschen.

Die aus den beiden Methoden der Präparatbeladungsmessung (III. 1.7.2) ermittelten Extinktionen entsprachen nach arithmetischer Mittelung sämtlicher Werte folgender Farbstoffmenge in mg:

Gelita: ΔE_{diff} 16 µg bei 3 mg Schwämmchen d.h.
5,3 µg Farbstoff / mg Schwämmchen

ΔE_{NaOH} 13 µg bei 3 mg Schwämmchen d.h.
4,3 µg Farbstoff / mg Schwämmchen

Spongostan:

ΔE_{diff} 16,5 µg bei 3 mg Schwämmchen d.h.
5,5 µg Farbstoff / mg Schwämmchen

ΔE_{NaOH} 16,5 µg bei 3 mg Schwämmchen d.h.
5,5 µg Farbstoff / mg Schwämmchen

Marbagelan: ΔE_{diff} 18 µg bei 3 mg Schwämmchen d.h.
6,0 µg Farbstoff / mg Schwämmchen

ΔE_{NaOH} 18 µg bei 3 mg Schwämmchen d.h.
6,0 µg Farbstoff / mg Schwämmchen

1.7.3 Standardabweichung der Beladung bei 30 gefärbten Schwämmchen pro Präparat

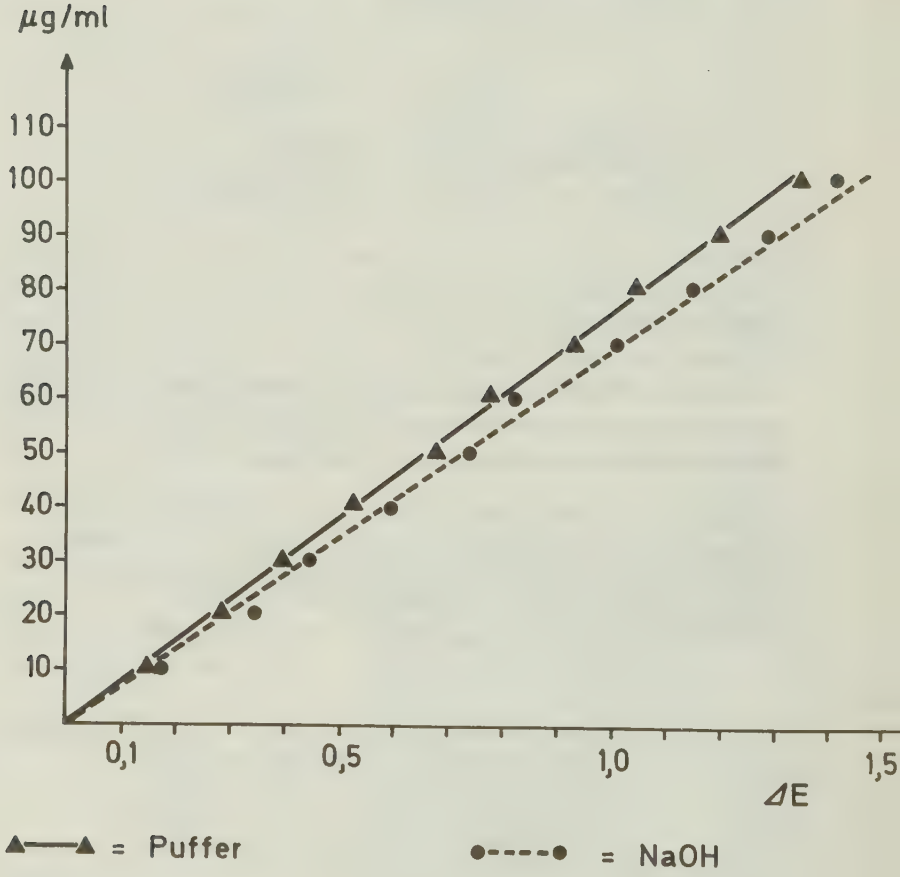
	σ	σ^2
Gelita	0,01836	0,0000618
Spongostan	0,02556	0,0006533
Marbagelan	0,02313	0,0005349

Zusatz zu Abb. 6:

Die Kurven der Abbildung zeigen den deutlichen Unterschied der Beladungsextinktionen, der sich durch die beiden Methoden der Beladungsmessung ΔE_{diff} und ΔE_{NaOH} ergibt:

Gelita zeigt höhere Werte für ΔE_{diff} im Gegensatz zu Marbagelan und Spongostan, die im Durchschnitt höhere Extinktionen bei der Farbstoffbeladungsmessung über ΔE_{NaOH} zeigen.

Farbstoff-Eichkurve mit Tris-Puffer bzw. 1 n NaOH als Lösungsmittel Charge 397

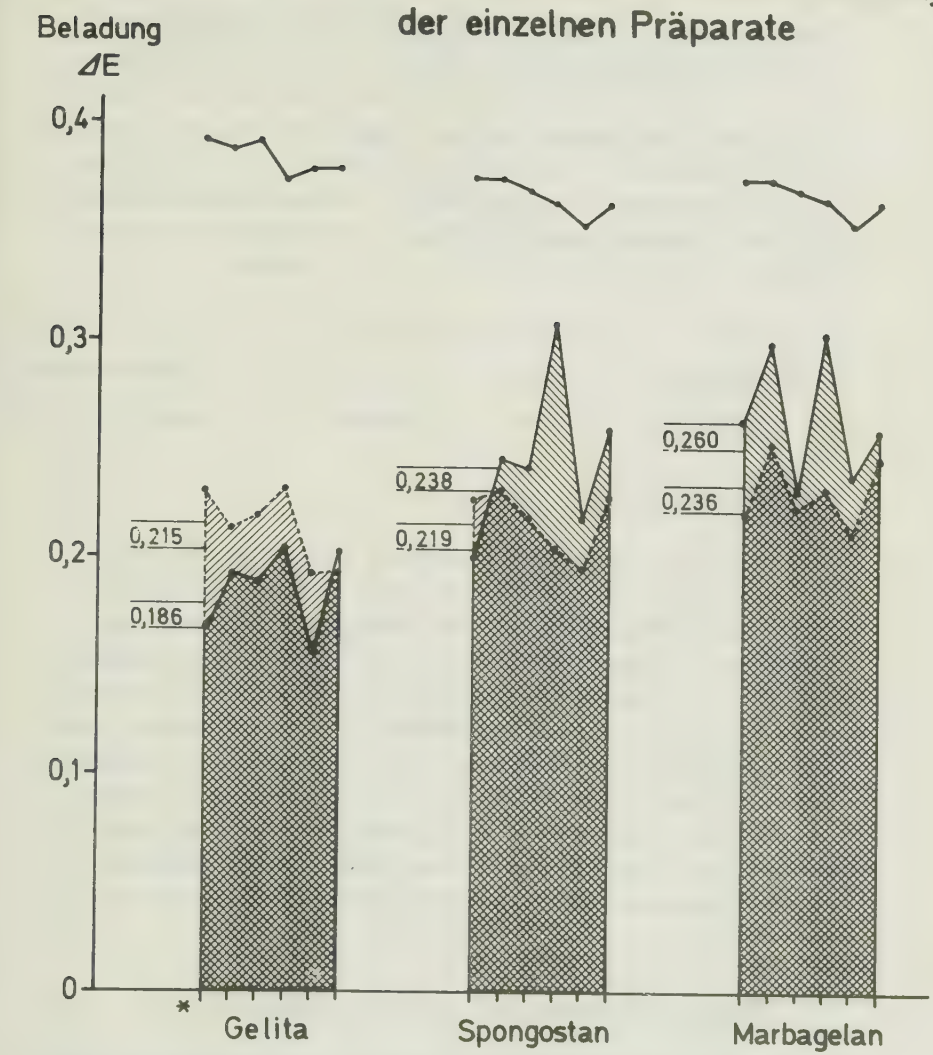


▲——▲ = Puffer ●----● = NaOH

Meßbedingungen : Eppendorf Photometer
Photozelle (blauempfindlich) 90 b
Filter 546 nm

Abb. 5

Kontinuität u. Quantität der Farbstoffbeladung der einzelnen Präparate



* Jeder Kurvenpunkt beinhaltet das arithm. Mittel aus 5 Meßwerten

= ΔE der Anfärbelösung: 0,3mg Farbstoff pro ml Puffer
≙ ΔE 0,355 - 0,400

= Farbstoffbeladungsmessung über ΔE_{NaOH}

= Farbstoffbeladungsmessung über ΔE_{diff}

Abb. 6

1.8 Enzymatische Abbauhemmung nach der Anlagerung des Farbstoffs

1.8.1 Ermittlung der optimalen Enzymkonzentration

Um einen standardisierten Abbau zu klarer Lösung im Bereich von einer Stunde Inkubationsdauer zu erreichen, mußten folgende Enzymkonzentrationen benutzt werden:

bei Gelita	0,025 mg	Collagenase / ml Inkubationsansatz
bei Spongostan	0,2 mg	Collagenase / ml Inkubationsansatz
bei Marbagelan	0,5 mg	Collagenase / ml Inkubationsansatz

1.8.2 Hemmversuche

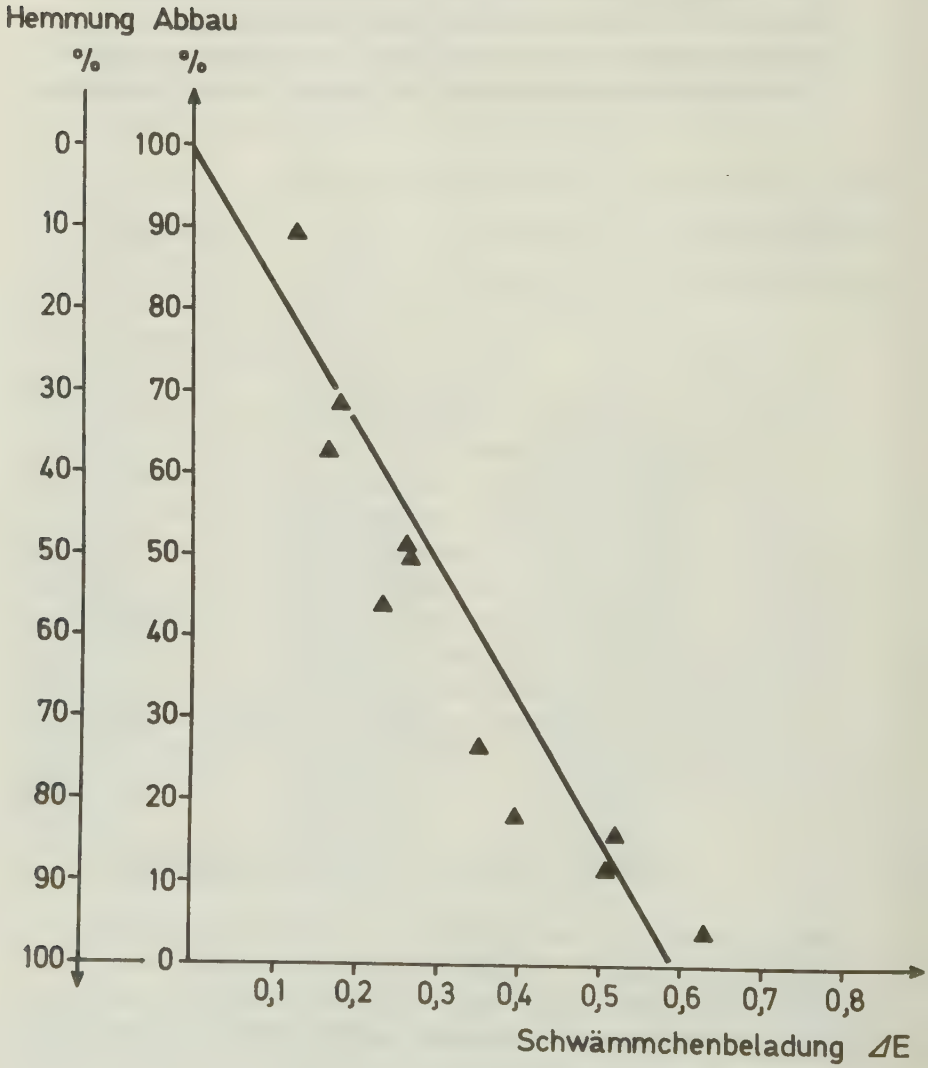
Rein subjektiv zeigte sich während des Versuchsverlaufs ein unterschiedlich schneller Abbau bei unterschiedlich stark mit Farbstoff beladenen Schwämmchen. Während bei niedrigster Farbstoffbeladung (4 µg Farbst. / mg Schwamm) bei 37° C Collagenaseabbau bereits schon klare Lösung vorhanden war, zeigte das Schwämmchen mit der höchsten Farbstoffbeladung (18,3 µg Farbst./mg Schwamm) erst Bruchstücke. Abb. 7, 8 und 9 zeigen die genauen Hemmkurven des Abbaus verschieden stark gefärbter Schwämmchen der einzelnen Präparate; ein direkter zeitlicher Vergleich war wegen der notwendigermaßen unterschiedlichen Enzymkonzentration nicht möglich.

1.9 Formalisationsgrad der einzelnen Präparate

Die Methode zum Nachweis von Spuren von Aldehyden mit HMBT ließ sich mit Erfolg auch bei unseren Präparaten anwenden. Bereits zu Reaktionsbeginn zeigte Marbagelan eine sofortige Farbreaktion (Grünfärbung), wogegen sich Gelita und Spongostan erst nach einiger Zeit gering grün färbten.

In der Abbildung zehn (Abb. 10) wurden die ermittelten Extinktionen des aus den Präparaten auslösbaren Formaldehyds auf die HMBT-Formaldehydeichkurve abgetragen. Auch hier hebt sich Marbagelan von den Präparaten Spongostan und Gelita durch einen hohen Formalisationsgrad stark ab. Die Konzentration des löslichen FA ist bei Marbagelan fast viermal so hoch wie bei den beiden anderen Präparaten.

Hemmung des enzymatischen Gelita-Abbaus nach Farbstoffanlagerung durch Collagenase

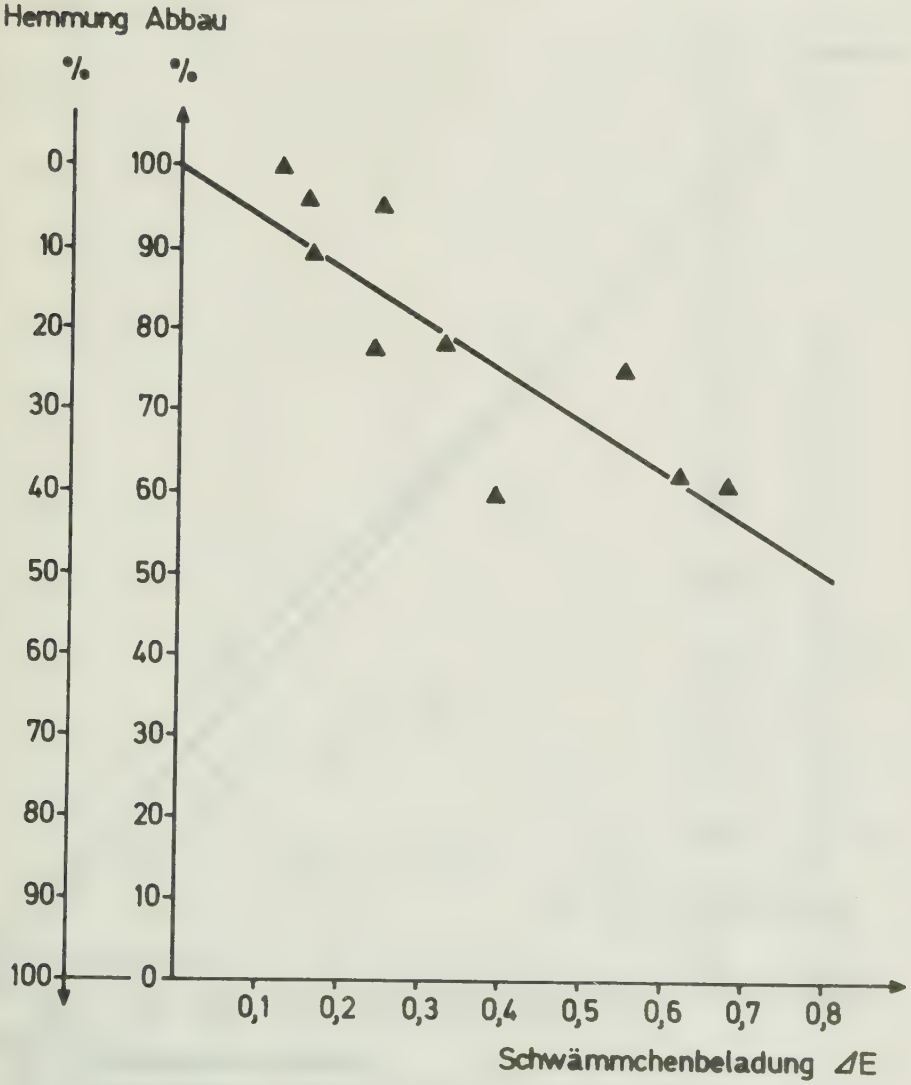


Beladung der Schwämmchen über ΔE_{diff} ermittelt

Enzymkonzentration 25 µl/ml

Abb. 7

Hemmung des enzymatischen Spongostan-Abbaus nach Farbstoffanlagerung durch Collagenase

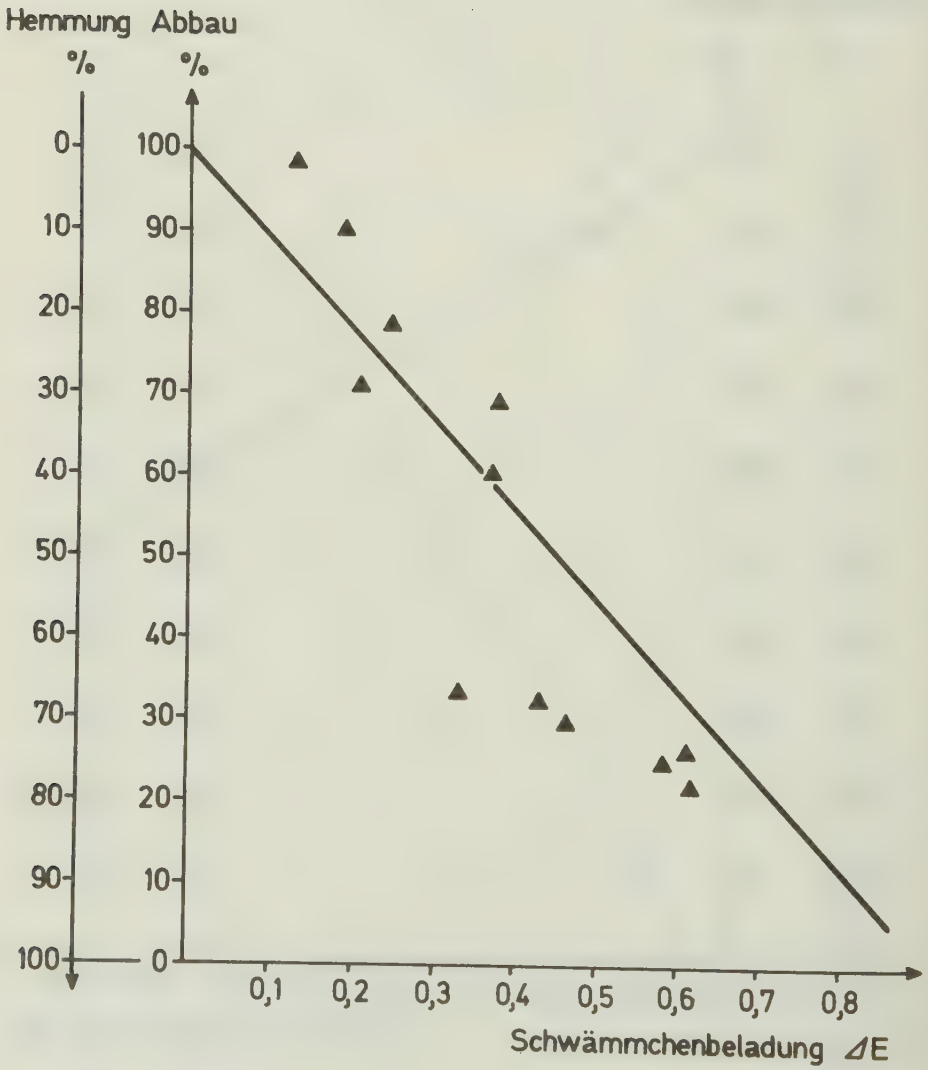


Beladung der Schwämmchen über ΔE_{diff} ermittelt

Enzymkonzentration 200 µl/ml

Abb. 8

Hemmung des enzymatischen Marbagelan - Abbaus nach Farbstoffanlagerung durch Collagenase

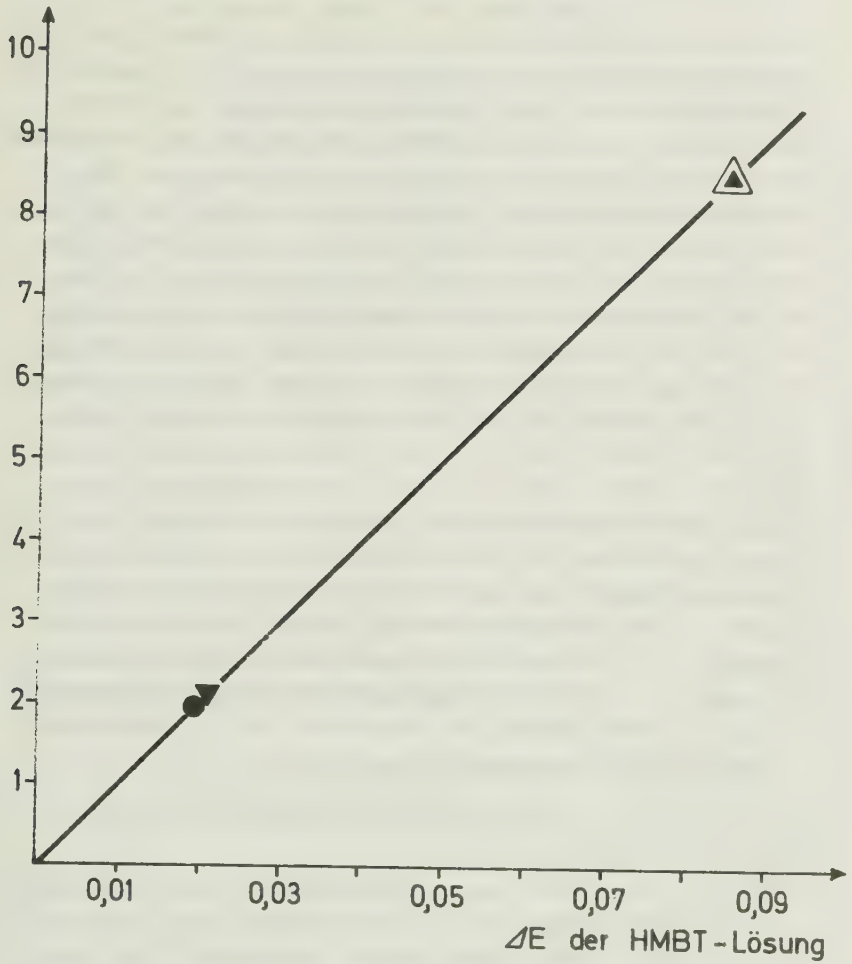


Beladung der Schwämmchen über ΔE_{diff} ermittelt

Enzymkonzentration 500 µl/ml

Abb. 9

Formaldehydkonzentration der einzelnen Präparate



△ = Marbagelan ▼ = Spongostan ● = Gelita

Einwaage :

30 mg Marbagelan lösten 8,7 µg FA ≙ 0,29 µg FA/mg
30 mg Spongostan lösten 2,2 µg FA ≙ 0,07 µg FA/mg
30 mg Gelita lösten 1,85 µg FA ≙ 0,06 µg FA/mg

Abb. 10

2. Tierexperimentelle Resorption von Gelita, Spongostan und Marbagelan in der Bulla des Meerschweinchens

Die Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen den Verlauf der Schwammresorption in Abhängigkeit von der Zeit, wobei die Zeitkoordinate in drei Maßstäben abgetragen ist. Jeder Kurvenpunkt stellt das arithmetische Mittel von Messwerten aus maximal fünf minimal drei Versuchstieren dar. Die unterschiedliche Anzahl kam dadurch zustande, daß von den pro Zeiteinheit operierten fünf Tieren nicht immer alle überlebten. Von insgesamt 40 Tieren, denen das Präparat Gelita implantiert wurde, verendeten 6 Tiere durch Sepsis nach Otitis media des operierten Ohres, 2 Tiere unmittelbar nach der Operation an Narkosefolgen. Bei der Explantation von Gelita aus der Bulla konnten folgende Einzelbefunde erhoben werden: 4 Tiere zeigten klinisch eine eitrige Infektion des Mittelohrs mit zunehmender Tendenz bei längerer Verweildauer der Präparate, bei den restlichen Tieren war die Bulla klinisch o.B. Von 20 Tieren, die noch Restschwamm in der Bulla hatten konnte bei 12 dieser in toto entnommen werden, bei 8 Tieren in kleinen Stücken. Ein gesetzmäßiger Zusammenhang des klinischen Befundes bei Explantation und der Art der Restschwammentnahme mit Abweichungen der Ergebnisse vom arithmetischen Mittel konnte nicht abgeleitet werden.

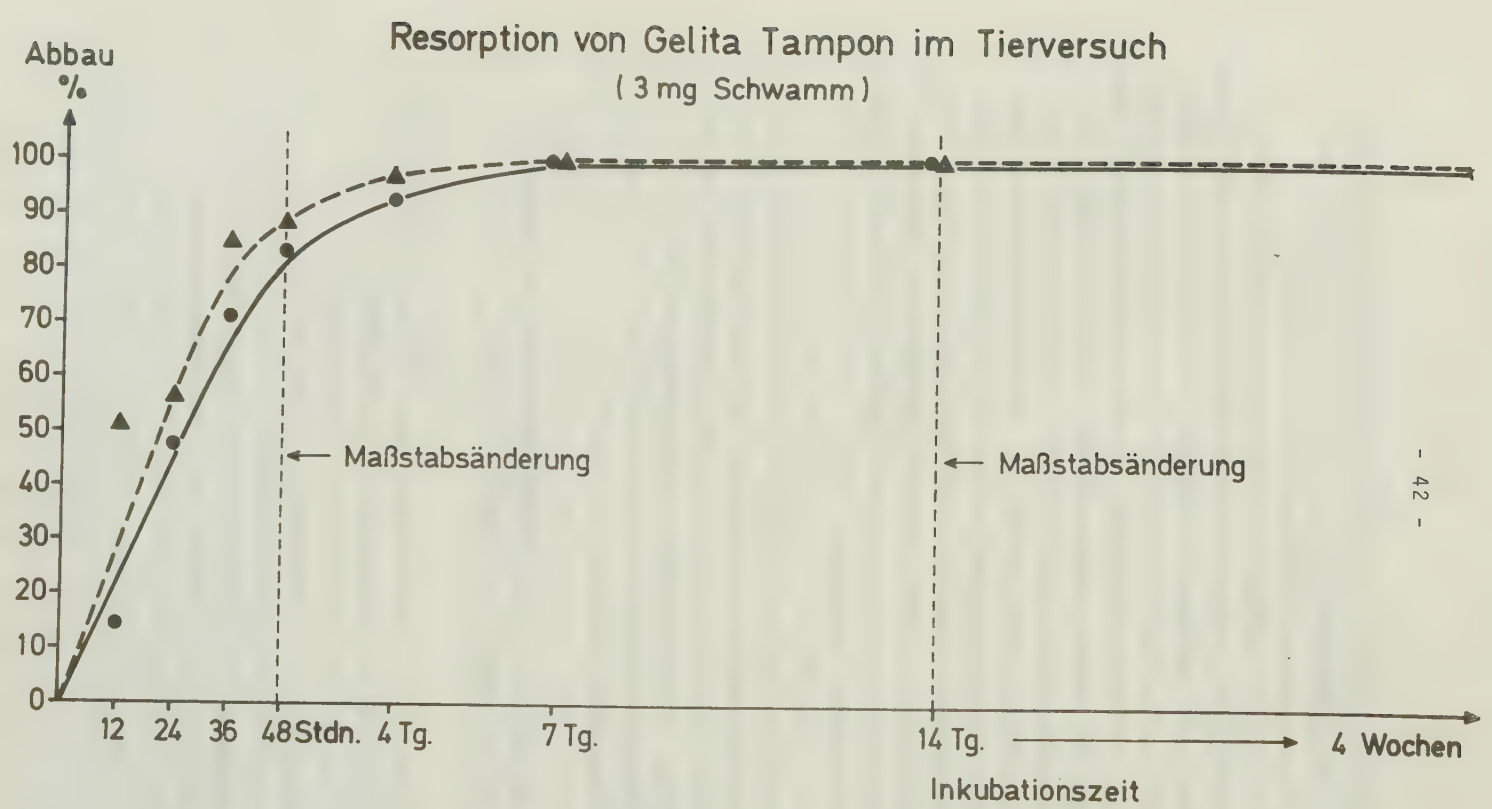
Bei Spongostan verendeten von 45 Versuchstieren 5 an Otitis media, 2 an Narkosefolgen.
Einzelbefunde der Bulla bei Explantation: Otitis media bei 5 Tieren, Mittelohrschleimhaut der restlichen Tiere o.B., bei Tieren mit Restschwamm konnte dieser bei 13 in toto, bei 15 in Stücken entnommen werden; Granulationsgewebsbildung am Restschwamm zeigte sich bei 6 Tieren mit aufsteigender Tendenz bei längerer Verweildauer. Auch hier konnten keine Zusammenhänge der Befunde mit Abweichungen vom arithmetischen Mittel der Ergebnisse gefunden werden. Bei der Versuchsreihe mit Marbagelan erlebten von 45 Tieren 8 den Explantationszeitpunkt nicht.

Vermutliche Todesursache war bei 4 Tieren Otitis media, bei 4 Narkosetrauma.
Im Einzelnen wurden folgende Befunde erhoben:
15 Tiere Otitis media, 22 Tiere befundfreie Mittelohrschleimhaut; die Restschwammentnahme erfolgte bei 21 Tieren in toto, bei 15 Tieren in Stücken; zur Granulationsgewebsbildung kam es bei 12 Tieren, 4 Tiere reines Granulationsgewebe, 8 Tiere Granulationsgewebe mit Schwammresten. Die Tendenz zu gewebig durchwachsenem Schwamm stieg mit 14 Tagen Implantationsdauer stark an. Hier konnte auch ein wichtiger Befund erhoben werden: Tiere, die länger als 14 Tage Marbagelan implantiert hatten, zeigten einen Widerspruch zwischen subjektiv feststellbarem Restschwamm und den Extinktionen, die sich nach Auflösung in NaOH noch zeigten. Sie waren wesentlich niedriger als erwartet oder gar nicht mehr verwertbar.

Es liegt die Vermutung nahe, daß der Farbstoff in seiner photometrischen Qualität durch die histochemische Reaktion verändert worden war, da die entnommenen Restschwammstücke durchaus noch ursprüngliche Rotfärbung zeigten.
Entsprechend wurde auch die Kurve in Abb. 13 in "gefundenen" und "vermutlichen Abbau" unterteilt.

2.1 Durchschnittliche Standardabweichung der Abbauwerte vom arithmetischen Mittel derselben

	σ	σ^2
Gelita-Tampon	15,286017	233,66231
Spongostan	6,745345	45,49967
Marbagelan	7,188015	51,66755



●——● = bei Farbstoffbeladungsmessung über ΔE_{NaOH}

▲--▲ = bei Farbstoffbeladungsmessung über $\Delta E_{diff.}$

Abb. 11

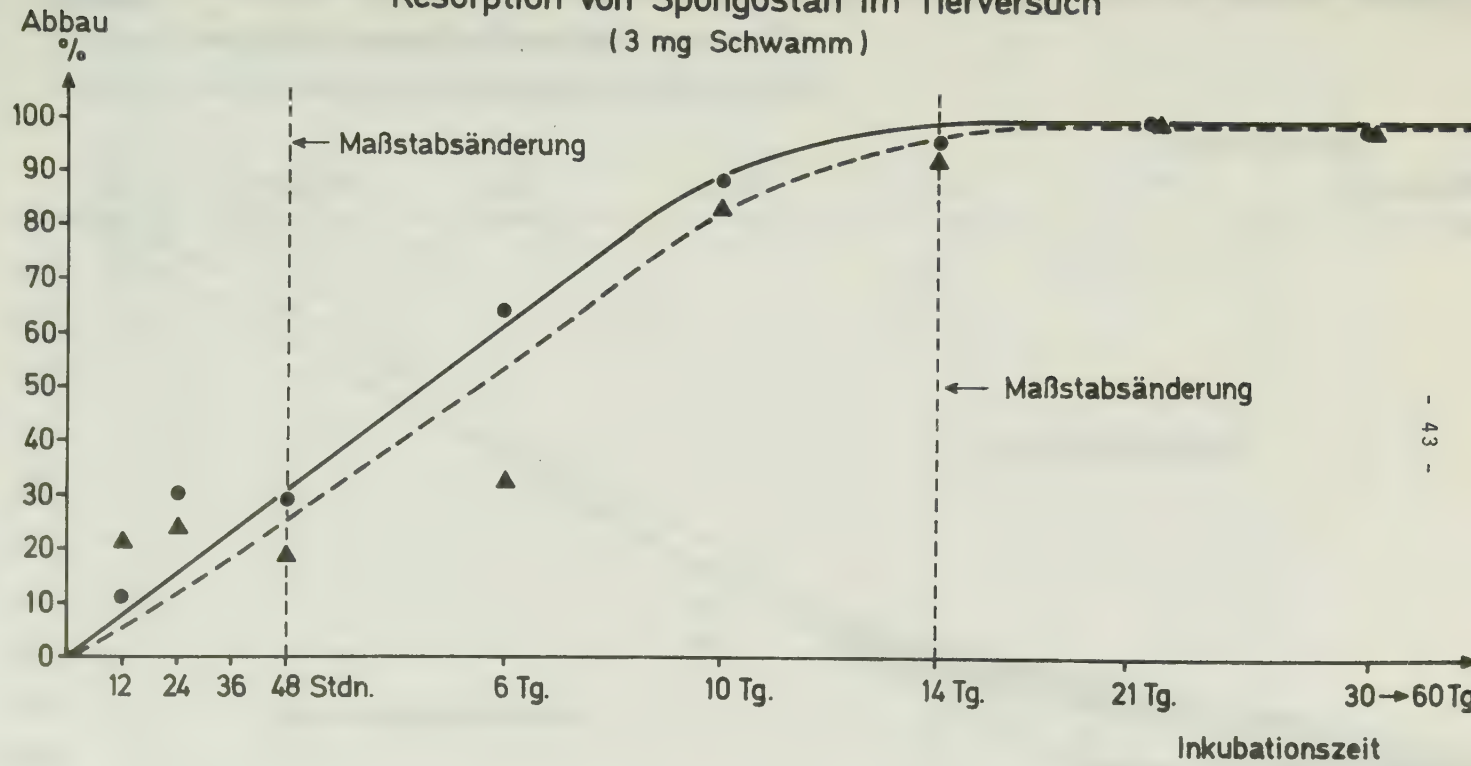
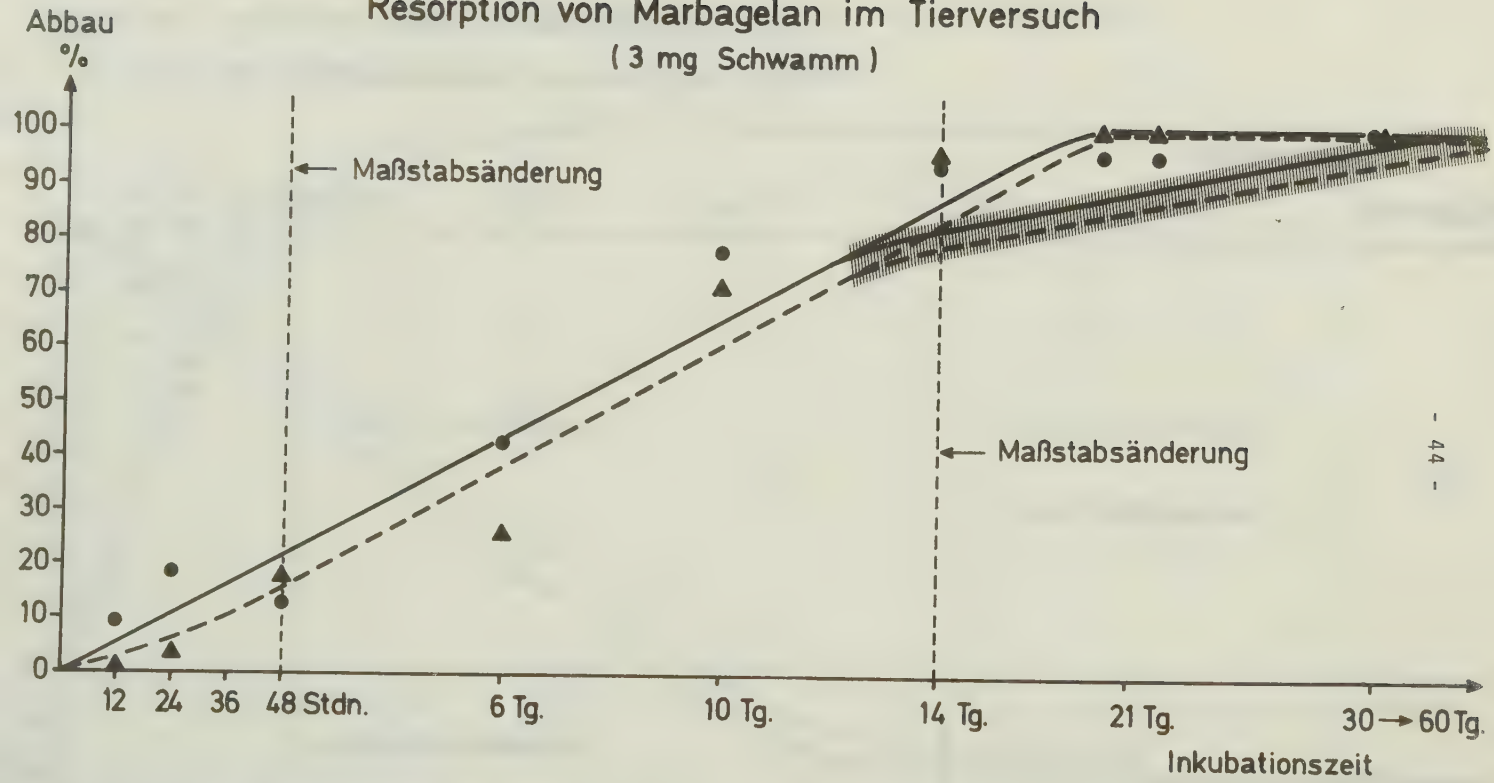

Resorption von Spongostan im Tierversuch
(3 mg Schwamm)
Abbau
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Maßstabsänderung
Maßstabsänderung
12
24
36
48 Stdn.
6 Tg.
10 Tg.
14 Tg.
21 Tg.
30→60 Tg
Inkubationszeit
● = bei Farbstoffbeladungsmessung über ΔE NaOH
▲ = bei Farbstoffbeladungsmessung über ΔE diff.

Abb. 12

Resorption von Marbagelan im Tierversuch

(3 mg Schwamm)



●——● = bei Farbstoffbeladungsmessung über ΔE_{NaOH}

▲– –▲ = bei Farbstoffbeladungsmessung über $\Delta E_{diff.}$

▒▒▒ = vermutlicher Abbau ; photometrische Qualität d. Farbstoffes vermutl. durch Granulationsreaktion verändert

V. DISKUSSION

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Resorption von Gelita-Tampon (R), Spongostan (R) und Marbagelan (R) im Mittelohr des Meerschweinchens quantitativ zu untersuchen. Die unterschiedliche Verwendung solcher Gelatinepräparate in der Mittelohrchirurgie verlangt genaue Kenntnis über den zeitlichen Verlauf ihres Abbaus, da sie für den klinischen Erfolg solcher Operationen von Bedeutung sind. Präparate, die zur Tamponade des äußeren Gehörgangs nach Mittelohroperationen oder zur Verödung von Radikalhöhlen dienen, sollten eine erwartungsgemäße Abbauzeit von ca. 3 Wochen haben, während Präparate, die zur Paukenhöhlenfüllung bei Tympanoplastik verwendet werden und die Funktion der Transplantatstützung und Ernährung haben, bereits nach drei Tagen zum größten Teil abgebaut sein müssen. Ein längerer Verbleib wäre hier nicht nur sinnlos, sondern würde durch die beginnende Granulationsreaktion das Operationsergebnis wesentlich verschlechtern. Entsprechend wurden bei den Tierversuchen die Implantationszeiträume innerhalb der ersten drei Tage besonders dicht aufeinanderfolgend gewählt. Bei der Frage der Methode war es entscheidend, eine Möglichkeit der quantitativen Erfassung von noch nicht abgebautem Restschwamm zu finden, der die Struktur der verwendeten Präparate nicht von vornherein verändert. Radioaktive Beladung der Schwämmchen mit markierten Aminosäuren kam nicht in Frage, da dies nur vom Hersteller direkt hätte bewerkstelligt werden können; außerdem mußte man mit einer schnellen Verteilung und Neueinbau der freigesetzten markierten Aminosäuren in den Organismus und in die das Präparat durchsetzenden weißen Blutzellen nach Resorption durch die Mittelohrschleimhaut rechnen, was eine Messung unmöglich machte.

Erst die Tatsache, daß in dem von Dr.S.HÖRNLE entwickelten Reaktivfarbstoff aus der Azoreihe ein Farbstoff zur Verfügung stand, der ganz im Gegensatz zu sonst üblichen

Farbstoffen, z.B. aus der Textilchemie bei neutralem pH kovalente Bindungen mit Proteinen ohne Denaturierung eingeht, machte eine quantitative Markierung und Bestimmung von definierten Schwammengen mit hinreichender Genauigkeit möglich.

Die Farbstoffbeladungsmessung der Schwämme mußte dabei immer auf die zwei beschriebenen Methoden ΔE_{diff} und ΔE_{NaOH} durchgeführt werden, da einerseits die Messung der Ausgangsbeladung der Schwämmchen nur durch die Extinktionsabnahme der Anfärbelösung festgestellt werden konnte, andererseits die Beladung der Restschwämmchen nach Entnahme aus dem Versuchstier nur durch Auflösung derselben in Natronlauge photometrisch meßbar waren. Da der Farbstoff bei Lösung in Puffer (Lösungsmittel der Anfärbelösung) und NaOH unterschiedlich absorbiert (vgl. Eichkurve Abb. 5), ergaben sich differierende Abbauwerte (vgl. Abb. 11, 12, 13), die je nach Rechnungsmethode (vgl. S. 23) eine Abbaukurve ergab.

Sinn der In-vitro-Versuche war es, durch Untersuchungen unter weitgehend standardisierten Bedingungen Aussagen über das chemische und physikalische Verhalten und besonders die enzymatische Abbaubarkeit der Präparate zu machen und die hierbei gewonnenen Ergebnisse mit den In-vivo-Versuchen zu korrelieren.

Die in den Tierversuchen gefundene Abbaubarkeit von Gelita, Spongostan und Marbagelan entsprach im Großem dem, was bereits bei den In-vitro-Versuchen klar geworden war.

Das größte spezifische Gewicht hat Marbagelan (Tab.II); es hat damit auch das pro Volumeneinheit größte Abbauquantum. Außerdem zeigt es auch die widerstandsfähigste Benetzbarkeit. Ein schwer benetzbarer Schwamm wird sich nicht so gut mit Flüssigkeit vollsaugen wie ein gut benetzbarer und kann sich damit auch weniger gut in seinem Volumen entfalten.

Das bedeutet, daß Schwammstücke, die zur Füllung eines definierten Hohlraumes bestimmt sind, von diesem Präparat ein größeres Ausgangsschwammstück verlangen als beim gut benetzbaren, und damit auch mehr Material abzubauen ist. Nach den Untersuchungen von BANDTLOW (21) ist die Durchfeuchtung der Schwammtamponade wichtige physikalische Voraussetzung für gute Abbaubarkeit. Nicht nur die Menge des pro Volumeneinheit abzubauenden Materials, sondern auch die chemische Angriffsfähigkeit wird vom Grad der Benetzung maßgeblich beeinflußt. Nicht benetzte, von Gas ausgefüllte Hohlräume stellen hier praktisch einen für Phagozyten und leukozytäre Enzyme nicht erreichbaren Ort dar. Dies wird sowohl von KLEY (16_1) als auch von DOYLE und KELLY (20) in ihren Versuchen bestätigt. Die photographische Darstellung (Abb. 4) zeigt ebenfalls eindrucksvoll die Sonderstellung von Marbagelan unter den getesteten Präparaten. Die völlig unregelmäßige Oberflächenstruktur mit feinsten Aufzweigungen und den recht zahlreichen Massenansammlungen stellen eine wesentlich schlechtere Ausgangssituation für einen schnellen Abbau dar. Diese Ergebnisse entsprachen genau den Beobachtungen im Tierversuch.

Nicht ganz so war dies bei den Implantationsergebnissen für Spongostan. Mit seinem relativ niedrigen spezifischen Gewicht wäre eigentlich ein schnellerer Abbau zu erwarten. Auch die gute Benetzbarkeit spricht dafür. In der photographischen Darstellung (Abb. 4) erscheint Spongostan zwar in typischer Schwammstruktur, doch sind bei der sehr großen Porenweite die Trabekel dicker als bei Gelita, außerdem kommt es häufiger zu Massenverdichtungen.

Wesentlich genauer weisen die Ergebnisse aus der Auflösung in 1N NaOH und der enzymatische Abbau mit Collagenase auf die Resultate aus den Tierversuchen hin.
Daß es sich bei den drei zu untersuchenden Präparaten hauptsächlich um Collagenpräparate handelt, zeigt die Aminosäureanalyse der Präparate.

Für Collagen wird ein durchschnittlicher Glycingehalt von 30-35 % angesetzt. Die Aminosäurezusammensetzung zeigt für alle drei Präparate die für Collagen typische (IV.1.5). Die für Collagen weiterhin spezifische Aminosäure Prolin und Hydroxyprolin sind bei allen Präparaten bis zu 18 % enthalten. Lediglich Gelita enthält keine hydroxylierten Aminosäuren. Die Einheitlichkeit der Zusammensetzung der Präparate ließ es daher auch als gerechtfertigt erscheinen, ausschließlich mit dem Enzym Collagenase die In-vitro-Versuche durchzuführen. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen zeigen ganz klar den Unterschied der aus den Tierversuchen zu erwartenden Abbaufähigkeit, wobei angenommen werden kann, daß das Spektrum der zellulären Proteasen sicher den Wirkungsbereich von Collagenase mit beinhaltet. Die Abbauzeiten von Gelita und den Präparaten Spongostan und Marbagelan durch Collagenase (IV.1.4) differieren dermaßen, daß bei gleicher Enzymkonzentration die Inkubationsbedingungen für die beiden letzten Präparate durch die mit der Zeit aufkommende bakterielle enzymatische Aktivität so verändert wurden, daß die Ergebnisse nicht mehr vergleichbar waren. Um hier in einer vertretbaren Abbauzeit von 20 bis ca. 90 Min. zu bleiben, mußte die Enzymkonzentration für Spongostan verachtfacht und für Marbagelan sogar verzwanzigfacht werden (IV. 1.8.1). Die Auflösbarkeit in 1N NaOH zeigt überraschend ähnliche Verhältnisse (IV. 1.3). Demnach scheint die Auflösbarkeit von Schwämmchen in 1N NaOH ein einfacher und schnell durchführbarer Test für die Beurteilung der Abbaubarkeit von Kollagenschwammpräparaten zu sein. Auch nach WULLSTEIN (23) hängt die unterschiedliche Resistenz der Präparate zu einem großen Teil vom Härtungsgrad der Schwämmchen ab. Die Gelatineschwämme werden durch Einblasen von Luft/Formaldehyd in denaturierte Gelatine gehärtet und als Schwamm gefestigt.

Die Ermittlung des löslichen Formaldehyds mit HMBT aus den einzelnen Präparaten (Abb. 10) zeigt, daß das Maß der Formalisierung direkt proportional mit der enzymatischen Abbaubarkeit und Löslichkeit in NaOH zu sein scheint.

Die Vermutung, daß die enzymatische Abbaubarkeit der Schwämmchen durch die Bindung von Farbstoff an das Schwämmchenprotein gestört wird, bestätigen unsere hierfür durchgeführten Hemmversuche(IV.1.8.). Die mittels einer Farbstoffverdünnungsreihe unterschiedlich angefärbten Schwämmchen zeigten einen mit steigender Farbstoffbeladung langsameren Abbau (Abb. 7, 8, 9). Die um das Proteinmolekül des Schwämmchenkollagens angelagerten Farbstoffmoleküle, die als Chelatkomplexe (vmtl. 1:2 Komplexe) recht groß sind, hindern wahrscheinlich das aktive Zentrum des Enzyms an seiner Anlagerungsmöglichkeit ans Substrat. Der in den Abb. 7, 8 und 9 dargestellte lineare Verlauf der Hemmkurven kann nur näherungsweise angenommen werden, da die Streuung der Einzelwerte groß ist; er liegt jedoch in einem für solche Versuche üblichen Rahmen und kann als Aussage über die Hemmung des Enzyms durch den Farbstoff betrachtet werden. Sie wurde im Tierversuch bei jedem Einzelergebnis entsprechend in Rechnung gestellt (vgl.S.23).

Die Bulla des Meerschweinchens mit ihrem weiten Lumen zeigte sich für unsere Untersuchungen als sehr geeignet. Bei einer Mortalitätsrate von 15 - 17 % kann die Narkose- und Operationsmethode bei den z.T. recht langen Inkubationszeiten als effektiv bezeichnet werden. Der retroaurikuläre Zugang erwies sich auch bei der Exkubation als vorteilhaft. Bei der Frage der Sterilität hielten wir uns an die Erfahrungen von KLEY (16_1), der zwischen steril und bewußt unsteril implantierten Schwämmchen keinen signifikanten Unterschied in der Resorptionsgeschwindigkeit feststellen konnte. Entsprechend wurde auf die Sterilität der Schwämmchen keinen besonderen Wert gelegt. Lediglich zum Zeitpunkt der Entnahme aus der Originalpackung war volle Sterilität gewährleistet; sie wurde im Laufe der Anfärbeprozedur sicher verloren. Die Operationswunde und das Instrumentarium wurden durch einfache Desinfektion relativ keimarm gehalten.

Die Implantation in bereits infiziertes bzw. durch frühere Infektionen verändertes Versuchsmaterial wurde durch genaue klinische Befunderhebung ausgeschlossen. Denn nach den Erfahrungen von BANDTLOW (21) ist die Resorption bei primär infizierten Tieren sehr unterschiedlich.

Der Abbau von Gelita im Meerschweinchenmittelohr, der nach sieben Tagen abgeschlossen war, hatte seine Hauptaktivität in den ersten drei Tagen. Diese Abbauzeit liegt weit unter der von anderen Autoren festgestellten (vgl. Tab. I, WITHERS, JOSEPH, BANDTLOW, BAUER u. KLEY). Dabei zeigt Gelita von allen Präparaten die größte Standardabweichung. Dies liegt vermutlich an der relativ kurzen Abbauzeit.

Der Abbau von Spongostan war nach 21 Tagen beendet. Auch diese Werte liegen unter denen, die von RAUCH u. BAUER (vgl. Tab. I) angegeben wurden. Dabei zeigt Spongostan ein anderes Verhalten als Gelita: Mit der längeren Implantationszeit wird auch der Fremdkörperreiz größer und damit die Granulationsgewebsbildung, die nach zehn Tagen Implantationszeit immer häufiger auftritt. Klinisch zeigt sich dies in Restschwammstücken, die mit feinem Gewebe durchwachsen waren.
Noch viel stärker war diese Reaktion bei Marbagelan. Oberflächenstruktur und Formalisationsgrad ließen dies auch vermuten. Noch nach dreißig Tagen war reichlich Restschwamm vorhanden, jedoch nie ohne daß er gewebig durchwachsen war. Diese Situation ließ sich durch unsere Methode, wie bereits erwähnt, nicht mehr quantitativ erfassen; obwohl in den bei der Explantation entnommenen Glümpchen von Granulationsgewebe noch reichlich Restschwamm vorhanden war, konnte nach Auflösung in NaOH keine nennenwerte Extinktion mehr ermittelt werden. Eine Grenze für den Beginn dieser veränderten und als eindeutig verfälscht zu bezeichnenden Verhältnisse zu ziehen wird schwierig sein.

Die in Abb. 13 gezeichnete vermutliche Kurve stützt sich lediglich auf die rein subjektiven Beobachtungen, daß ab der Inkubationsdauer 14 Tage die beschriebenen Verhältnisse fast ausschließlich angetroffen wurden. Entsprechend wurde die Kurve von diesem Zeitpunkt ab verändert. Ob dies auch für Spongostan gilt, ist schwer zu sagen; kein Befund weist jedenfalls darauf hin.

Die relativ große Streubreite der einzelnen Abbauwerte bei den Tierversuchen ist auf die normal zu erwartende unterschiedliche Reaktionsweise der Tiere zu großen Teilen wie bereits erwähnt zurückzuführen. Größere Differenzen kann auch nach KLEY (16_1) die nie gleichmäßige Durchfeuchtung der inkubierten Schwämmchen zur Folge haben, da die Phagozytose hiervon wesentlich beeinflußt wird. Auch die Tubendurchgängigkeit, die die Sauerstoffzufuhr und den Abtransport nach KLEY (16_1) von verflüssigtem Schwammaterial ermöglicht konnte nicht überprüft bzw. bei Verlegung des Tubenostiums nicht korrigiert werden.

Trotz der zu erwartenden Streubreiten beim Arbeiten im lebenden Tier und den in der Regel zu beobachtenden Unterschieden von In-vivo- und In-vitro-Versuchen, zeigten die Untersuchungen klar, daß die Tierversuche mit den In-vitro-Versuchen sehr gut übereinstimmen.

Die Ergebnisse grenzen damit auch eindeutig die Verwendungsfähigkeit der untersuchten Präparate Gelita-Tampon, Spongostan und Marbagelan ab. Während Gelita für die Verwendung im Mittelohr in Frage kommt, können Spongostan und Marbagelan nur an Stellen angewendet werden, an denen ein langsamer Abbau erwünscht ist; dies kann, wie die Untersuchungen zeigen, besonders auch dort der Fall sein, wo die Anwendung von Gelatineschwamm zu einer vermehrten Bindegewebsentwicklung führen soll, wie es beispielsweise bei der Verödung von Radikalhöhlen angestrebt wird.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden in In-vitro-Versuchen die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Gelatineschwammpräparate Gelita-Tampon(R), Spongostan(R) und Marbagelan(R) getestet.

Im Tierversuch wurde in der Bulla von insgesamt 130 Meerschweinchen die Abbaubarkeit der drei Präparate quantitativ untersucht. Dies wurde durch Anfärbung der Präparate mit einem Reaktivfarbstoff, der die Molekülstruktur der Schwämmchen nicht veränderte, erreicht. Durch photometrischen Vergleich des vom Schwamm gebundenen Farbstoffs vor und nach der Implantation ins Tier konnte eine quantitative Aussage über den Abbau der einzelnen Präparate in Abhängigkeit von der Implantationszeit gemacht werden.

In In-vitro-Versuchen wurde das spezifische Gewicht, die Benetzungsfähigkeit, in photographischer Darstellung die Oberflächenstruktur und mittels Peptidanalyse die chemische Zusammensetzung ermittelt. Im standardisierten enzymatischen Inkubationstest mit Collagenase wurden die Präparate nach ihrer Abbaufähigkeit eingeordnet. Ihre chemische Lösungsresistenz auf 1N Natronlauge wurde überprüft.

Der hemmende Einfluß des Farbstoffs auf den enzymatischen Abbau nach Bindung ans Schwammprotein wurde durch Anfärben von Schwämmchenquanten in einer Verdünnungsreihe und anschließendem Abbautest mit Collagenase für jedes Präparat erfaßt.

Der Formalisationsgrad als Parameter für die Abbaugeschwindigkeit von Gelatineschwämmen wurde durch Nachweis des löslichen Formaldehyds für jedes Präparat bestimmt.
Durch retroaurikulären Zugang wurde Gelita 12 Std., 24 Std., 36 Std., 48 Std., 4 Tage, 14 Tage und 4 Wochen lang, Spongostan und Marbagelan 12 Std., 24 Std., 36 Std., 48 Std., 6 Tage, 10 Tage, 14 Tage, 21 Tage, 30 Tage und 60 Tage lang implantiert.

Dabei kam es zu folgenden Ergebnissen:
In den In-vitro-Versuchen zeigte sich Gelita als sehr leicht abbaubar, während die Abbaubarkeit von Spongostan als mittelschwer und die von Marbagelan als schwer zu bezeichnen war.
Die Benetzungsfähigkeit, die Oberflächenstruktur und der Formaldehydgehalt ließen dieses Ergebnis erwarten.

Im üblichen Abweichungsbereich stimmten die Ergebnisse aus den In-vitro-Versuchen mit denen aus den Tierversuchen sehr genau überein. Dabei war Gelita nach 7 Tagen abgebaut, wobei sich das Hauptgeschehen in den ersten 3 Tagen abspielte, der Abbau von Spongostan war nach 14 bis 20 Tagen abgeschlossen. Bei Marbagelan traten nach 14 Tagen Schwierigkeiten in der Messbarkeit des Restschwammes auf, was sich dadurch bemerkbar machte, daß noch eindeutig Restschwamm mit Granulationsgewebe explantiert werden konnte, das Photometer nach Auflösen desselben jedoch keine nennenswerte Extinktion mehr zeigte.

Die gefundenen Ergebnisse wurden diskutiert und die Bedeutung für die klinische Relevanz erörtert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

ARMES, J.N.:(31) Nature and Amounts of Aldehyde in Gelatine. J.Phot.Sc. 14, 143-148 (1966)

BANDTLOW, O.:(21) Experimentelle Untersuchungen zur plastischen Wiederherstellung des Trommelfells. Habil.-Schrift Würzburg 1964

BAUER, E.:(12) Zur Frage der sekundären Adhäsivprozesse der Tympanoplastik. Zschr.Laryng. 34, 257 (1955)

CORREL, J.T. and E.C. WISE:(10) Certain Properties of a New Physiological Absorbable Sponge. Proc.Sec.Exper.Biol. 58, 233 (1945)

DOYLE-KELLY, W.:(20) Behaviour of Absorbable Gelatine Sponge in the Animal's Middle Ear. J.Laryng.Otol. 75, 155 (1961)

HARRISON, W.H. et al.:(4) Prosthetics in the Middle Ear. Arch.Otolaryngol. 69, 661-669 (1959)

HODGES, G.F.:(5) Tympanoplasty. The Laryngoscope 69, 672-681 (1959)

HOUBEN WEYL:(24) Cyanurchloridderivate als Reaktivfarbstoffe. Bd. 10-3, S. 390 Stuttgart: Thieme 1965

HOUBEN WEYL:(25) Methoden der vergleichenden Chemie, Metallkomplexverbindungen von O,O-Dihydroxy-azoverbindungen. Bd. 10-3, S. 452 Stuttgart: Thieme 1956

INGRAHAM, F.D. and O.T. BAILEY:(14) The Use of Products Prepared from Human Fibrinogen and Human Thrombin in Neurosurgery. J.Neuro Surg. 1, 23-44 (1944)

JOSEPH, R.B.:(13) The Effect of Absorbable Gelatine Sponge, Preparations and Other Agents and Scar Formation in the Dog's Middle Ear. The Laryngoscope 72, 1528 (1962)

KLEY, W.:(16) Probleme der Tympanoplastik. Zschr.Laryng. 34, 271 (1955)

KLEY, W.:(16_1)a) Probleme der Tympanoplastik, Resorption der Schwammtamponade im Tierversuch. Zschr.Laryng. 36, 277 (1957)

b) Ober die Nachbehandlung der hörverbessernden Operationen. Zschr.Laryng. 36, 495 (1957)

KLEY, W. und O. BANDTLOW:(17) Untersuchungen über die Einheilung des freien Hauttransplantates. Zschr. Laryng. 38, 480 (1959)

LIGHT, R.U. and H.R. PRENTICE:(11) Gelatine Sponge, Surgical Investigation of a New Matrix Used in Conjunction with Thrombin in Hemostasis. Arch.Surg. 51, 69 (1945)

MANDL, I., McLENNAN and E.L. HOWES:(27) Isolation and Charakterisation of Proteinase and Collagenase from Chlostridium Histolyticum. J.Cli.Invest. 32, 1323 (1953)

MERCK, E.:(32) Merck Reagentien Darmstadt 9/578, 10/374 L.

MORGAN, F.J., H.J. MORTON and P.C. PARKER: (19) Nutrition of Animal Cells in Tissue Culture. Initial Studies on a Synthetic Medium. Proc.Soc.Exper.Biol. and Med. 73, 1 (1950)

MONDLICHE MITTEILUNGEN(34) Mündliche Mitteilung von Dr. S. Hörnele Physiolog.Chem.Inst. Univ.Tübingen

NAGAI, Y.:(28) Specifity of Collagenase on Synthetic Peptids. J.Biochem. 50, 493 (1961)

ORMEROD and K. McKEY:(6) The Technique of Plastic Operations on the Sound Conducting Apparatus. J.Laryngol. and Otol. 70, 648-636 (1956)

PICH EMERY, I.:(7) Surgical Repair of the Sound Conductiv Mechanism of the Middle Ear. Ann.Otol.Rhinol. and Laryngol. 66, 1044-1063 (1957)

PLESTER, D.:(34) Fortschritte in der Mikrochirurgie des Ohres in den letzten Jahren. HNO. 18, 33 (1970)

RAUCH, S.:(18) Neue Gesichtspunkte zur Applikation von Gelatineschwamm. Prakt.Oto-rhino-laryngo. 20, 361 (1958)

SAWICKI, E. et al.:(30) The 3-Methyl-2-benzothiazolane-Test; Sensitive New Methods for the Detection, Rapid Estimation and Determination of Aliphatic Aldehyds. Anal.Chem. 33, 93 (1961)

SCHUKNECHT, H.F.:(8) Tympanopalsty. The Laryngoscope 69, 614-643 (1959)

TABB, H.G.:(9) Closure of Perforation of the Tympanic Membrane by Vein Grafts. The Laryngoscope 70, 271-286 (1960)

WITHERS et al.:(15) The Effect of buring Epithelium in the middle Ear of the Animals. Trans.Amer.Acad.Ophthal.Otol. 64, 863 (1960)

WULLSTEIN, H.:(22) Funktionelle Operationen im Mittelohr mit Hilfe des freien Spaltlappentransplantates. Arch.f.ONK-Heilkunde 161, 422 (1952)

WULLSTEIN, H.:(1) Theorie and Practice of Tympanoplasty. The Laryngoscope 66, 1076-1093 (1956)

WULLSTEIN, H.:(2) The Restauration of Function of the Middle Ear in Chronic Otitis Media. Ann.Otol.Rhinol.Laryngol. 65, 1020-1041 (1956)

WULLSTEIN, H.:(23) Operationen zur Verbesserung des Gehörs. Stuttgart: Thieme (1958)

ZÖLLNER, F.:(3) The Principles of Plastic Surgery of the Sound Conducting Apparatus. J.Laryngol. and Otol. 69, 637-652 (1955)

ZOLLINGER, H.:(33) Katalyse der elektrophilen Substitution des Chlors durch Carbonsäuren. Angewandte Chemie 73, 125 (1961)

Die vorliegende Arbeit kam auf die Anregung von Herrn Prof. Dr. D. Plester zustande und wurde unter Anleitung von Priv. Doz. Dr. R. Langnickel und Dr. A. Jung in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten und im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Priv. Doz. Dr. Langnickel danke ich für die Betreuung beim tierexperimentellen Teil meiner Arbeit.

Herrn Dr. A. Jung danke ich für die fachliche Führung bei den Versuchen in seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. S. Hörnle (Physiolog. Chem. Institut der Universität Tübingen) danke ich für den von ihm entwickelten Farbstoff, der mir bei meinen Versuchen zur Verfügung stand, und die freundliche Beratung.

Herrn Prof. Dr. M. Arnold (Anatomisches Institut der Universität Tübingen) danke ich für die Herstellung der mikroskopisch-photographischen Darstellung der verwendeten Präparate.

Herrn Prof. Dr. R. E. Bader (Hygienisches Institut der Universität Tübingen) danke ich für die Unterstellung und Versorgung der Versuchstiere im Tierstall des Hygienischen Instituts.

LEBENSLAUF

Am 7.August 1949 wurde ich, Norbert Salenbauch, in Leutkirch im Allgäu als 4. Kind des Alfons Salenbauch, Oberregierungsrat a.D. und seiner Frau Elisabeth geb. Zartmann geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und des staatlichen Gymnasiums in Ehingen, wo ich 1968 die Reifeprüfung ablegte, leistete ich den Grundwehrdienst in Weingarten (Württ.) als Sanitätsdienstgrad ab. Nach einsemestrigem Biologiestudium begann ich im Sommersemester 1970 mit dem Studium der Zahnheilkunde, bestand am 11.10.1973 die zahnärztliche Vorprüfung und beendete am 24.6.1976 das zahnmedizinische Staatsexamen in Tübingen.